



Universidade de Aveiro  
Departamento de Química  
Ano 2012

Rui Filipe Garcia  
Gonçalves

*Colocasia esculenta* (L.) Shott: perfil  
fenólico e bioatividade





**Universidade de  
Aveiro  
Ano 2012**

Departamento de Química

**Rui Filipe Garcia  
Gonçalves**

***Colocasia esculenta* (L.) Shott: perfil  
fenólico e bioatividade**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química (Ramo Química Orgânica e Produtos Naturais), realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação científica da Doutora Paula Andrade, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.



*Aos meus pais,  
pelo apoio incondicional que me têm dado ao longo desta minha caminhada...*



## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva**

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade**

Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Prof. Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão**

Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto





## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação não seria possível sem a ajuda e colaboração de diversas pessoas, a quem endereço os meus mais sinceros agradecimentos, nomeadamente:

Ao Professor Doutor Artur Silva, pelo tempo, disponibilidade e compreensão demonstrada ao longo de todo o trabalho desta dissertação.

À Professora Doutora Paula Andrade devo um agradecimento muito especial. Muito obrigado por acreditar em mim, por todos os conselhos, disponibilidade, e por me ter dado todas as condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Patrícia Valentão, pelo acompanhamento e pelo incentivo que me ajudaram a vencer as dificuldades do dia-a-dia.

Ao Professor Doutor Federico Ferreres, o meu obrigado pelo trabalho de identificação dos compostos por LC-MS.

À Ana Margarida Silva pelo apoio prestado no desenvolvimento deste projeto.

À INOVA, na pessoa do Doutor Engenheiro João Silva, pelo fornecimento das amostras de iname dos Açores.

A todos os colaboradores do laboratório de Farmacognosia o meu obrigado por toda a cooperação nos bons e maus momentos.

## Keywords

*Colocasia esculenta* (L.) Shott, phenolic compounds, HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, antioxidant activity.

## Abstract

*Colocasia esculenta* (L.) Shott is an annual herbaceous plant belonging to the Araceae family, commonly known in Portugal as "Inhame dos Açores". The cultivation of this plant is mainly due to its tuber, an essential food for millions of people. In addition to its nutritional value, taro is known for its medicinal properties and has been traditionally used to treat various diseases. In the Azores taro leaves are used by the indigenous to treat dermal wounds. This property may be related to the anti-inflammatory activity of phenolic compounds, which exert the mechanisms by sequestering free radicals involved in the inflammatory process, which may adversely affect the repair process in protracted situations.

Therefore, seeking the valorization of taro crop in the Azores archipelago, this thesis aimed to characterize, quantify and compare the phenolic fraction of the different varieties and culture conditions of taro from Azores, as well as relate the phenolic profile of different varieties with their antioxidant capacity.

The characterization of the different varieties by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> allowed the identification of 41 phenolic compounds, 34 of which were described for the first time in this species. The application of a reproducible method of quantification by HPLC-DAD demonstrated that there are qualitative and quantitative differences between the different varieties.

The evaluation of antioxidant activity against the radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazilo (DPPH<sup>•</sup>), superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and nitric oxide (NO<sup>•</sup>) of the three varieties showed that the extract of *C. esculenta* presents greater potential for against superoxide radical. The phenolic profile of the different varieties is directly related to the scavenging of DPPH<sup>•</sup>, though it was not possible to conclude the same about the scavenging of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and <sup>•</sup>NO. Probably other compounds, not detected by us, are involved in the scavenging of these species, although we cannot completely neglect the influence of phenolic compounds, since these may exert synergistic effects on other antioxidant compounds.

The wound repair property attributed to *C. esculenta* may be related to its capacity to scavenge superoxide radical, but more studies must be conducted, as there are other stages in the healing process, as well as other mechanisms of action involved.

## Palavras-chave

*Colocasia esculenta* (L.) Shott, compostos fenólicos, HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, atividade antioxidante.

## Resumo

*Colocasia esculenta* (L.) Shott é uma planta herbácea anual que pertence à família Araceae, comumente conhecida em Portugal por “Inhame dos Açores”. O cultivo desta planta deve-se sobretudo ao seu tubérculo, um alimento essencial para milhões de pessoas. Para além do seu valor nutricional, o inhame é conhecido pelas suas propriedades medicinais e tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de diversas doenças. Nos Açores, as folhas de inhame são usadas pelos autóctones no tratamento de lesões dérmicas. Esta propriedade poderá estar relacionada com a atividade anti-inflamatória de compostos fenólicos, que a exercem por mecanismos de sequestração de radicais livres envolvidos no processo inflamatório, que poderá ser prejudicial ao processo de reparação em situações prolongadas.

Assim, visando a valorização da cultura do inhame no arquipélago dos Açores, esta dissertação teve como objetivos caracterizar, quantificar e comparar a composição fenólica das diferentes variedades e condições de cultura de inhame dos Açores, assim como relacionar o perfil fenólico das diferentes variedades com a sua capacidade antioxidante.

A caracterização das diferentes variedades por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> permitiu a identificação de 41 compostos fenólicos, dos quais 34 foram descritos pela primeira vez nesta espécie. A aplicação de um método de quantificação reprodutível por HPLC-DAD demonstrou a existência de diferenças qualitativas e quantitativas entre as diferentes variedades estudadas.

A avaliação da atividade antioxidante contra os radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e óxido nítrico (<sup>•</sup>NO) das três variedades, demonstrou que o extrato de *C. esculenta* apresenta maior potencial antioxidante para o radical superóxido. O perfil fenólico das diferentes variedades está diretamente relacionado com a sequestração do radical DPPH<sup>•</sup>, no entanto o mesmo não foi possível concluir relativamente à sequestração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e <sup>•</sup>NO. Provavelmente outros compostos, não detetados por nós, estarão envolvidos no sequestro destas espécies, não negligenciando totalmente a influência dos compostos fenólicos, uma vez que estes poderão exercer efeitos sinérgicos juntamente com outros compostos antioxidantes.

A propriedade de reparação de lesões dérmicas atribuída à *C. esculenta* poderá estar relacionada com a sua capacidade de sequestração do radical superóxido, no entanto mais estudos terão de ser conduzidos, uma vez que existem outras etapas no processo de cicatrização, assim como outros mecanismos de ação envolvidos.



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2012

**Rui Filipe Garcia  
Gonçalves**

***Colocasia esculenta* (L.) Shott: perfil  
fenólico e bioatividade**





**Universidade de  
Aveiro  
Ano 2012**

Departamento de Química

**Rui Filipe Garcia  
Gonçalves**

***Colocasia esculenta* (L.) Shott: perfil  
fenólico e bioatividade**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química (Ramo Química Orgânica e Produtos Naturais), realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação científica da Doutora Paula Andrade, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.



*Aos meus pais,  
pelo apoio incondicional que me têm dado ao longo desta minha caminhada...*





## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva**

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade**

Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Prof. Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão**

Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto



## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação não seria possível sem a ajuda e colaboração de diversas pessoas, a quem endereço os meus mais sinceros agradecimentos, nomeadamente:

Ao Professor Doutor Artur Silva, pelo tempo, disponibilidade e compreensão demonstrada ao longo de todo o trabalho desta dissertação.

À Professora Doutora Paula Andrade devo um agradecimento muito especial. Muito obrigado por acreditar em mim, por todos os conselhos, disponibilidade, e por me ter dado todas as condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Patrícia Valentão, pelo acompanhamento e pelo incentivo que me ajudaram a vencer as dificuldades do dia-a-dia.

Ao Professor Doutor Federico Ferreres, o meu obrigado pelo trabalho de identificação dos compostos por LC-MS.

À Ana Margarida Silva pelo apoio prestado no desenvolvimento deste projeto.

À INOVA, na pessoa do Doutor Engenheiro João Silva, pelo fornecimento das amostras de inhame dos Açores.

A todos os colaboradores do laboratório de Farmacognosia o meu obrigado por toda a cooperação nos bons e maus momentos.



## Palavras-chave

*Colocasia esculenta* (L.) Shott, compostos fenólicos, HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, atividade antioxidante.

## Resumo

*Colocasia esculenta* (L.) Shott é uma planta herbácea anual que pertence à família Araceae, comumente conhecida em Portugal por “Inhame dos Açores”. O cultivo desta planta deve-se sobretudo ao seu tubérculo, um alimento essencial para milhões de pessoas. Para além do seu valor nutricional, o inhame é conhecido pelas suas propriedades medicinais e tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de diversas doenças. Nos Açores, as folhas de inhame são usadas pelos autóctones no tratamento de lesões dérmicas. Esta propriedade poderá estar relacionada com a atividade anti-inflamatória de compostos fenólicos, que a exercem por mecanismos de sequestração de radicais livres envolvidos no processo inflamatório, que poderá ser prejudicial ao processo de reparação em situações prolongadas.

Assim, visando a valorização da cultura do inhame no arquipélago dos Açores, esta dissertação teve como objetivos caracterizar, quantificar e comparar a composição fenólica das diferentes variedades e condições de cultura de inhame dos Açores, assim como relacionar o perfil fenólico das diferentes variedades com a sua capacidade antioxidante.

A caracterização das diferentes variedades por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> permitiu a identificação de 41 compostos fenólicos, dos quais 34 foram descritos pela primeira vez nesta espécie. A aplicação de um método de quantificação reproduzível por HPLC-DAD demonstrou a existência de diferenças qualitativas e quantitativas entre as diferentes variedades estudadas.

A avaliação da atividade antioxidante contra os radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e óxido nítrico (<sup>•</sup>NO) das três variedades, demonstrou que o extrato de *C. esculenta* apresenta maior potencial antioxidante para o radical superóxido. O perfil fenólico das diferentes variedades está diretamente relacionado com a sequestração do radical DPPH<sup>•</sup>, no entanto o mesmo não foi possível concluir relativamente à sequestração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e <sup>•</sup>NO. Provavelmente outros compostos, não detetados por nós, estarão envolvidos no sequestro destas espécies, não negligenciando totalmente a influência dos compostos fenólicos, uma vez que estes poderão exercer efeitos sinérgicos juntamente com outros compostos antioxidantes.

A propriedade de reparação de lesões dérmicas atribuída à *C. esculenta* poderá estar relacionada com a sua capacidade de sequestração do radical superóxido, no entanto mais estudos terão de ser conduzidos, uma vez que existem outras etapas no processo de cicatrização, assim como outros mecanismos de ação envolvidos.



## Keywords

*Colocasia esculenta* (L.) Shott, phenolic compounds, HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, antioxidant activity.

## Abstract

*Colocasia esculenta* (L.) Shott is an annual herbaceous plant belonging to the Araceae family, commonly known in Portugal as "Inhame dos Açores". The cultivation of this plant is mainly due to its tuber, an essential food for millions of people. In addition to its nutritional value, taro is known for its medicinal properties and has been traditionally used to treat various diseases. In the Azores taro leaves are used by the indigenous to treat dermal wounds. This property may be related to the anti-inflammatory activity of phenolic compounds, which exert the mechanisms by sequestering free radicals involved in the inflammatory process, which may adversely affect the repair process in protracted situations.

Therefore, seeking the valorization of taro crop in the Azores archipelago, this thesis aimed to characterize, quantify and compare the phenolic fraction of the different varieties and culture conditions of taro from Azores, as well as relate the phenolic profile of different varieties with their antioxidant capacity.

The characterization of the different varieties by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> allowed the identification of 41 phenolic compounds, 34 of which were described for the first time in this species. The application of a reproducible method of quantification by HPLC-DAD demonstrated that there are qualitative and quantitative differences between the different varieties.

The evaluation of antioxidant activity against the radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazilo (DPPH<sup>•</sup>), superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and nitric oxide (NO<sup>•</sup>) of the three varieties showed that the extract of *C. esculenta* presents greater potential for against superoxide radical. The phenolic profile of the different varieties is directly related to the scavenging of DPPH<sup>•</sup>, though it was not possible to conclude the same about the scavenging of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and <sup>•</sup>NO. Probably other compounds, not detected by us, are involved in the scavenging of these species, although we cannot completely neglect the influence of phenolic compounds, since these may exert synergistic effects on other antioxidant compounds.

The wound repair property attributed to *C. esculenta* may be related to its capacity to scavenge superoxide radical, but more studies must be conducted, as there are other stages in the healing process, as well as other mechanisms of action involved.





# **Índice**



# Índice

ÍNDICE	XVII
LISTA DE FIGURAS	XXI
LISTA DE TABELAS	XXV
LISTA DE ABREVIATURAS	XXIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Shott	1
1.2. Compostos fenólicos e seu metabolismo	3
1.2.1. Ácidos fenólicos	6
1.2.2. Flavonoides	7
1.3.1. Métodos espectroscópicos	11
1.3.1.1. Espectroscopia UV-Vis	11
1.3.1.2. Espectrometria de massa	14
1.3.1.2.1. Elucidação estrutural de flavonoides e os seus glicósidos	16
1.3.1.2.1.1. Geninas	16
1.3.1.2.1.2. Flavonoides O-glicósidos, C-glicósidos e O,C-glicósidos	18
1.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)/azoto (RNS) e <i>stress</i> oxidativo	23
1.4.1. Espécies reativas de oxigênio (ROS)	23
1.4.2. Espécies reativas de azoto (RNS)	27
1.4.3. Mecanismos de defesa antioxidante	28
1.4.3.1. Agentes antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos)	29
1.4.3.2. Agentes antioxidantes exógenos	31
1.4.4. Ensaio <i>in vitro</i> para a avaliação da capacidade antioxidante	35
1.4.4.1. Atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH <sup>•</sup> )	36
1.4.4.2. Atividade sequestrante do radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	37
1.4.4.3. Atividade sequestrante do radical óxido nítrico ( <sup>•</sup> NO)	38
1.5. Inflamação e reparação de lesões	39
1.6. Objetivos	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Substâncias de referência e reagentes	45
2.2. Amostras	46
2.3. Extração de compostos fenólicos	46

2.4.	Análise qualitativa de compostos fenólicos por HPLC-DAD- ESI/MS <sup>n</sup>	47
2.5.	Análise quantitativa de compostos fenólicos por HPLC-DAD	48
2.5.1.	Método de HPLC e padrões externos usados	48
2.5.2.	Validação do método de quantificação	49
2.6.	Avaliação do potencial antioxidante	50
2.6.1.	Ensaio do radical DPPH	50
2.6.2.	Ensaio do radical anião superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	52
2.6.3.	Ensaio do radical óxido nítrico (*NO)	53
2.7.	Análise estatística	55
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1.	Caracterização de compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS <sup>n</sup>	59
3.2.	Validação de um método para a quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	70
3.3.	Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD	72
3.4.	Atividade antioxidante	78
4.	CONCLUSÕES	82
5.	BIBLIOGRAFIA	87

## **Lista de Figuras**



## Lista de Figuras

Figura 1. Folhas de <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Shott.....	2
Figura 2. Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos existentes na Natureza. ....	6
Figura 3. Exemplos de ácidos benzóicos existentes na Natureza. ....	7
Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides. ....	8
Figura 5. Biossíntese de flavonoides. ....	9
Figura 6. Grupos responsáveis pelo surgimento de duas bandas de absorção no ultravioleta e visível.....	12
Figura 7. Esquema de um equipamento de HPLC/MS. ....	14
Figura 8. Nomenclatura de iões produto de diagnóstico de flavonas (A) e flavonois (B). ....	17
Figura 9. Iões produto de diagnóstico de flavonas ( $R_1=H$ ) e flavonois ( $R_1=OH$ ) formados pela fragmentação por retro-Diels-Alder (RDA).....	18
Figura 10. Nomenclatura usada para os iões de glicósidos de flavonas .....	19
Figura 11. Formação dos radicais $[Y_0-H]^-$ e $Y_0^-$ por clivagem homolítica e heterolítica, repectivamente. ....	20
Figura 12. Iões produto característicos formados a partir de clivagens nos resíduos hexose (A) e pentose (B). ....	21
Figura 13. Grupos de agentes antioxidantes e suas ações. SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; GST: glutathione-S-transferase. ....	28
Figura 14. Ciclo de oxidação-redução da glutathione, NADPH e NADH na matriz mitocondrial. ....	31
Figura 15. Sequestro de espécies reativas por parte do ácido ascórbico e sua regeneração pela glutathione. ....	32
Figura 16. Características estruturais desejáveis que possibilitam a capacidade antioxidante dos flavonoides. ....	33
Figura 17. Exemplo de inativação de uma espécie radicalar por parte da quercetina. $RO^\bullet$ : espécie radicalar; RH: molécula neutra.....	34
Figura 18. Quelatação de metais por parte dos flavonoides. $M^{n+}$ : ião metálico.....	34
Figura 19. Mecanismo da reação entre o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH $^\bullet$ ) e um agente antioxidante (A-H), formando-se a 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH-H) e um radical do antioxidante (A $^\bullet$ ). ....	36
Figura 20. Reação da formação de $O_2^{\bullet-}$ pelo sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH, da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a formazano por parte do $O_2^{\bullet-}$ e a ação de um sequestrador antioxidante no meio. ....	37
Figura 21. Reação de Griess. ....	38
Figura 22. Ensaio de sequestração do DPPH $^\bullet$ .....	51
Figura 23. Ensaio de sequestração do $O_2^{\bullet-}$ .....	52



Figura 24. Ensaio de sequestração do $\cdot\text{NO}$ . .....	54
Figura 25. Perfil cromatográfico a 340 nm dos compostos fenólicos identificados no extrato aquoso das folhas de <i>C. esculenta</i> . Variedades (A) “branco gigante” e (B) “vermelho” .....	60
Figura 26. Esquema de fragmentação MS em modo negativo de luteolina-6- <i>C</i> -(6- <i>O</i> -hexosil)hexósido (11) e apigenina-6- <i>C</i> -(6- <i>O</i> -hexosil)hexósido (16).....	65
Figura 27. Análise MS <sup>2</sup> de [M-H] <sup>-</sup> de luteolina-6- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -pentosil)hexósido (27) e apigenina-8- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -pentosil)hexósido (32). .....	66
Figura 28. Esquema de fragmentação MS no modo negativo de luteolina-6- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -pentosil)hexósido (27) e apigenina 8- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -pentosil)hexósido (32).....	67
Figura 29. Análise MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup> e MS <sup>3</sup> [(M-H)→(M-H-162)] <sup>-</sup> e esquema de fragmentação no modo negativo de luteolina-6- <i>C</i> -(3- <i>O</i> -hexosil)hexósido-8- <i>C</i> -pentósido (19). .....	68
Figura 30. Análise MS <sup>3</sup> [(M-H)→(M-H-162)] <sup>-</sup> de apigenina-6- <i>C</i> -pentósido-8- <i>C</i> -hexósido-7- <i>O</i> -hexósido (8), apigenina-6- <i>C</i> -pentósido-8- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -hexosil)hexósido (28) e apigenina-6- <i>C</i> -(2- <i>O</i> -hexosil)hexósido-8- <i>C</i> -pentósido (30).....	69
Figura 31. Teor relativo em relação ao conteúdo total das diferentes classes de compostos fenólicos presentes nas diferentes variedades de <i>C. esculenta</i> . .....	74
Figura 32. Teor relativo em relação ao conteúdo total dos diferentes derivados de compostos fenólicos presentes nas diferentes variedades de <i>C. esculenta</i> . .....	75
Figura 33. Curva dose-resposta das diferentes variedades de <i>C. esculenta</i> contra o radical DPPH. ....	78
Figura 34. Estrutura química de quatro flavonas mono- <i>C</i> -glicosiladas.....	79
Figura 35. Curva dose-resposta das diferentes variedades de <i>C. esculenta</i> contra o radical superóxido.....	80
Figura 36. Curva dose-resposta das diferentes variedades de <i>C. esculenta</i> contra o radical óxido nítrico. ....	81

## **Lista de Tabelas**



## Lista de tabelas

Tabela 1. Máximos de absorção dos espectros de UV-Vis de várias classes de compostos fenólicos.....	12
Tabela 2. Banda II no espectro UV de flavonas contendo apenas oxidação no anel B.....	13
Tabela 3. Amostras de <i>C. esculenta</i> analisadas neste trabalho.....	46
Tabela 4. Tempo de retenção (Tr) e espectros de UV, MS: [M-H] <sup>-</sup> e MS <sup>2</sup> : [M-H] <sup>-</sup> de flavonoides das folhas de <i>C. esculenta</i> .....	63
Tabela 5. Equações de regressão linear, limites de detecção e limites de quantificação para análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	70
Tabela 6. Repetibilidade e precisão intermédia do método para a análise da composição fenólica por HPLC-DAD.....	71
Tabela 7. Ensaio de recuperação (exatidão).....	72
Tabela 8. Quantificação dos compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras de <i>C. esculenta</i> (mg/kg de peso seco).....	73
Tabela 9. Valores de IC <sub>50</sub> dos três ensaios realizados. ....	78



## **Lista de abreviaturas**



## Lista de abreviaturas

**[M-H]<sup>+</sup>** - íon pseudomolecular

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** - oxigénio singlete

**2way ANOVA** - análise de variância bidimensional (de *two-way Analysis of Variance*)

**A<sup>•</sup>** - radical do antioxidante

**ABS** - inhame “branco” tratado sem rega (sequeiro)

**A-H** – antioxidante

**amu** - unidades de massa atómica (de *atomic mass units*)

**APCI** - ionização química a pressão atmosférica (de *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

**Asc<sup>•</sup>** - radical semidesidroascorbato

**AscH** - ácido desidroascórbico

**AscH<sup>•</sup>** - ascorbato

**AscH<sub>2</sub>** - ácido ascórbico

**CAT** - catalase

**CI** - ionização química

**CID** - dissociação por colisão induzida (de *Collision Induced Dissociation*)

**COX** - cicloxygenase

**DAD** - detetor de díodos (de *Diode Array Detector*)

**DNA** - ácido desoxirribonucleico (de *Deoxyribonucleic Acid*)

**DPPH<sup>•</sup>** - radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

**DPPH-H** - 1,1-difenil-2-picril-hidrazina

**EI** - impacto eletrónico (de *Electronic Impact*)

**ESI** - *electrospray*

**FAB** – ionização por bombardeamento com átomos rápidos (de *Fast Atom Bombardment*)

**FAFB** - inhame “branco” tratado com água fria permanentemente

**FAQ1** - inhame “branco” tratado com água quente

**GC** - cromatografia em fase gasosa

**GPx** - glutational peroxidase

**GR** - glutational redutase



**GSH** - glutationa

**GSR** - conjugados de glutationa

**GSSG** - glutationa oxidada

**GST** - glutationa-S-transferase

**H** - hidrogénio

**HPLC** - cromatografia líquida de alta eficiência (de *High Performance Liquid Cromathography*)

**HPLC-DAD- ESI/MS<sup>n</sup>** - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e um detetor de massa com ionização por *electrospray* e analisador de massa Tandem

**HPLC-DAD** - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos

**Ion-Trap** – detetor de armadilha de iões

**LC** - cromatografia líquida

**LC/MS** - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

**LOD** - limite de deteção (de *Limit of Detection*)

**LOQ** - Limite de quantificação (de *Limit of Quantification*)

**LOX** - lipoxigenase

**LSIMS** - de *Liquid secondary ion mass spectrometry*

**m/z** - razão massa/carga em espectrometria de massa

**MS** - espectrometria de massa (de *Mass Spectrometry*)

**MS<sup>n</sup>** – espetrometria de massa Tandem

**NADH** – dinucleótido de β-nicotinamida e adenina

**NADPH** - fosfato de dinucleótido de β-nicotinamida e adenina

**NBT** - azul de nitrotetrazólio (de *nitro blue tetrazolium*)

**NI** - ionização química em modo negativo (de *Negative Ionization*)

**NOS** - óxido nítrico sintase

**NOX** - NAD(P)H oxidase

**ODS** – octadecilsilano

**ONOO<sup>-</sup>** - anião peroxinitrito

**PI** – ionização química em modo positivo (de *Positive Ionization*)

**PMS** - metossulfato de fenazina (de *Phenazine Methosulphate*)

**PUFA** - ácidos gordos polinsaturados (de *Polyunsaturated Fatty Acids*)

**R<sup>•</sup>** - espécie radicalar  
**r<sup>2</sup>** - Coeficiente de correlação linear  
**RH** - molécula neutra  
**RNS** - espécies reativas de azoto  
**RO<sup>•</sup>** - radicais alcóxido  
**ROO<sup>•</sup>** - radicais peróxido  
**ROOH** - peróxido orgânico  
**ROS** - espécies reativas de oxigénio  
**RP** - fase reversa (de *Reversed Phase*)  
**RSD** - desvio padrão relativo  
**S** - declive  
**Se-OH** - selenona  
**SFC** - cromatografia de fluidos supercríticos (de *Supercritical Fluid Chromatography*)  
**SNP** - nitroprussiato de sódio (de *Sodium Nitroprusside*)  
**SOD** - superóxido dismutase  
**UV** - Ultravioleta  
**UV-vis** - Ultravioleta-Visível  
**XO** - xantina oxidase  
**σ** - desvio padrão residual da reta de regressão linear



# **Introdução**



## 1. Introdução

Desde há centenas de anos que a descoberta de produtos naturais e a medicina se encontram intimamente ligados através da pesquisa dos agentes terapêuticos usados na “medicina tradicional”. Os estudos clínicos, farmacológicos e químicos das terapias usadas pela “medicina tradicional”, que utiliza principalmente extratos à base de plantas, estiveram na base dos primeiros medicamentos.<sup>1</sup> Atualmente, tendo em conta o conhecimento adquirido e os constantes avanços na biologia, fisiologia e outras, a indústria farmacêutica consegue sintetizar novas moléculas a partir dos compostos naturais, evitando assim a sua laboriosa extração e isolamento. Contudo, apesar do custo da obtenção de moléculas sintéticas ser inferior e de fácil implementação à escala industrial, nem sempre os resultados obtidos são os pretendidos. Muitas vezes não é possível sintetizar o composto desejado (como é o exemplo da síntese de compostos quirais).<sup>2</sup> Muitas outras vezes, quando o processo de síntese torna possível a obtenção da molécula formulada, a aplicação desta não apresenta o resultado desejado, provavelmente porque as doenças não se devem a um único fator e é improvável que um único composto seja efetivo contra os vários fatores que despoletam uma qualquer doença.<sup>3</sup> Por esta razão, a visão simplista de um composto ativo, um mecanismo de ação, está a ser ultrapassada pela utilização de extratos ativos multialvo à base de plantas usadas na “medicina tradicional”. A identificação dos metabolitos que compõem estes extratos ativos e os seus possíveis efeitos sinérgicos e aditivos têm sido alvo de estudo por parte dos investigadores ligados à área da saúde na atualidade.

### 1.1. *Colocasia esculenta* (L.) Shott

*Colocasia esculenta* (L.) Shott é uma planta herbácea anual que pertence à família Araceae, comumente conhecida em Portugal por “Inhame dos Açores”. *C. esculenta* é uma planta alta, com um tubérculo ou um cáudice pequeno e robusto, com flores e folhas (**Figura 1**).<sup>4</sup>

Esta planta tem a sua origem na região Indo-malásia, provavelmente no leste da Índia e Bangladesh, espalhando-se posteriormente para o leste e sudeste Asiático, ilhas do

Pacífico e oeste do Egito e Mediterrâneo Oriental. Atualmente é também cultivada no sul e oeste do Mediterrâneo, África, Américas e Caribe.<sup>5-8</sup> O cultivo da *C. esculenta* deve-se sobretudo ao seu tubérculo, um alimento essencial para milhões de pessoas, sendo considerada o 14º vegetal/alimento básico mais cultivado em todo o mundo.<sup>7, 9</sup> Dependendo das variedades e das tradições culturais locais, outras partes da planta, como as folhas, flores e os caules, são também consumidos, nomeadamente em molhos, purés, ensopados e sopas.<sup>10, 11</sup> Nos Açores o tubérculo é usado na alimentação humana e de outros animais. As folhas são usadas na conservação de queijo fresco e requeijão.



**Figura 1.** Folhas de *Colocasia esculenta* (L.) Shott.

Os tubérculos de *C. esculenta* são uma fonte de energia, sob a forma de amido facilmente digerido. Contêm também outros hidratos de carbono e são pobres em gordura e proteína.<sup>12</sup> Outros nutrientes contidos no tubérculo são a vitamina C, a tiamina, a riboflavina, a niacina<sup>13</sup> e quantidades relativamente importantes de ferro, cálcio, potássio e magnésio.<sup>14</sup> As suas folhas contêm elevados níveis de proteínas, fibra dietética, e são importantes fontes de caroteno assim como nos nutrientes descritos nos tubérculos.

À semelhança dos tubérculos e raízes em geral, *C. esculenta* é deficiente na maioria das outras vitaminas e restantes minerais. O principal fator anti-nutricional desta planta é a presença de ráfides de oxalato de cálcio que devem ser destruídas por cozedura completa antes do seu consumo.<sup>13</sup>

Para além do seu valor nutricional o inhame é conhecido pelas suas propriedades medicinais e tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de várias doenças, tais como asma, artrite, diarreia, hemorragia interna, distúrbios neurológicos e doenças de pele.<sup>4</sup> Nas ilhas Açorianas a seiva e folhas são usadas na reparação de lesões cutâneas.

Estas propriedades terapêuticas podem dever-se, em parte, à presença de metabolitos secundários como os compostos fenólicos. Estes compostos são ubíquos nas plantas superiores<sup>15</sup> e, como resultado do reconhecimento das suas ações fisiológicas no organismo humano, o interesse pela sua análise tem vindo a aumentar cada vez mais.<sup>16</sup> Inúmeros estudos têm relacionado o consumo de polifenóis, como parte da dieta humana, com uma baixa incidência de doenças cardiovasculares. Adicionalmente, estes compostos são também descritos como agentes anti-inflamatórios, antialérgicos, hepatoprotetores e antivirais, entre outros.<sup>17, 18</sup> Para além destas propriedades benéficas que garantem aos polifenóis um importante papel na alimentação como nutracêuticos, estes compostos são também marcadores taxonómicos muito uteis na autenticação de plantas.<sup>17, 19</sup>

Apesar da importância tradicional, histórica e socio-económica da cultura do inhame para a região Açoriana não existe nenhum estudo de carácter científico sobre *C. esculenta* produzida nos Açores. Relativamente à composição fenólica das folhas de *C. esculenta* apenas quatro estudos revelam a presença de alguns derivados de antocianinas, flavonóis e flavonas.<sup>11, 20-22</sup>

## **1.2. Compostos fenólicos e seu metabolismo**

O metabolismo é uma complexa rede de milhares de reações químicas pelas quais as células crescem, reproduzem-se, alimentam-se, excretam resíduos, movem-se e comunicam umas com as outras.<sup>23</sup> Os compostos envolvidos nessas reações denominam-se metabolitos e pertencem a dois grandes grupos: os metabolitos primários e os secundários.

Os metabolitos primários são aqueles que são produzidos e estão envolvidos em processos metabólicos vitais, como a respiração e fotossíntese. Estes compostos são



pequenas moléculas como açúcares simples e polissacarídeos, aminoácidos, ácidos tricarboxílicos (intermediários do Ciclo de Krebs), proteínas e ácidos nucleicos. Estes metabolitos são idênticos na maioria dos organismos, diferindo em detalhes estruturais de organismo para organismo. No entanto, aparentam ter funções universais, tais como enzimáticas, estruturais e armazenamento da informação genética.<sup>24</sup>

A biossíntese de metabolitos secundários ocorre por vias que derivam do metabolismo primário. Existe um grande número de metabolitos secundários distribuídos na natureza, principalmente nas plantas superiores. Durante muito tempo, estes foram considerados subprodutos de reações de metabolitos primários e que não tinham um papel primordial no crescimento e desenvolvimento desses organismos. Atualmente entende-se por metabolismo secundário, o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos organismos vivos, por não serem necessários a todos eles. No entanto, são imprescindíveis para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo a esse mesmo ecossistema e respondendo pelas relações e interações entre indivíduo e ambiente. Acredita-se que organismos que possuem estes metabolitos são favorecidos pelo processo de seleção natural.<sup>22</sup> O estudo do metabolismo, mecanismo de ação e distribuição destes compostos provou e prova ser útil em variadíssimas áreas como a ecologia, química orgânica, bioquímica, micologia, ficologia, fisiologia das plantas ou ciências farmacêuticas. Todas estas áreas se interligam e permitem a aplicação dos conhecimentos obtidos na indústria farmacêutica, na perfumaria, na indústria alimentar, em agronomia e na indústria agroquímica ou na horticultura.<sup>15</sup>

Os compostos fenólicos são os metabolitos secundários mais comuns na natureza, principalmente no Reino Vegetal. Estes compostos desempenham inúmeras funções importantes nas plantas, permitindo que estas se adaptem às mudanças dos fatores bióticos e abióticos. Servem de suporte estrutural em vários tecidos, estão envolvidos em estratégias de defesa e sinalização, particularmente na interação entre as plantas e o seu ambiente.<sup>15</sup>

O elemento estrutural fundamental que caracteriza todos os compostos fenólicos é a presença de pelo menos um anel aromático substituído por, pelo menos, um grupo hidroxilo livre ou ligado formando uma outra função (éter, éster ou glicosídica). Contudo, uma definição baseada unicamente na sua estrutura química é insuficiente, uma vez que

muitos outros metabolitos, pertencentes a outros grupos fitoquímicos, possuem estes elementos estruturais. Por este motivo, para além dos aspetos estruturais, tornou-se necessário considerar também a origem biossintética para melhor definir um composto fenólico.<sup>25</sup>

Nas plantas, os fenóis derivam de duas vias biossintéticas de aromatização, a via do ácido xiquímico e a via acetato. A via do ácido xiquímico é o conjunto de reações metabólicas em que os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e o triptofano são formados a partir de metabolitos provenientes do processo metabólico primário, a glicólise e a via da pentose-fosfato (fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, respetivamente). Estes aminoácidos são, por sua vez, os precursores de variadíssimos metabolitos secundários. A fenilalanina e o triptofano são considerados aminoácidos essenciais para os humanos, uma vez que são necessários para o seu funcionamento, mas estes não têm a capacidade de os sintetizar, tendo por isso de os obter através da dieta, pela ingestão de alimentos ricos em proteínas.<sup>25, 26</sup> No entanto, as plantas superiores e outros organismos conseguem sintetizar estes três aminoácidos essenciais, que por desaminação dão origem a ácidos cinâmicos e seus derivados, como por exemplo os ácidos benzóicos, as acetofenonas, as lenhanas, as lenhinas e as cumarinas.<sup>25</sup>

A via acetato começa com este e dá origem a poli- $\beta$ -cetoésteres de várias dimensões, que por ciclização, através da condensação de Claisen ou aldólica, originam metabolitos policíclicos como cromonas, isocumarinas, orcinóis, depsidas, depsinóides e quinonas.<sup>25</sup>

Estas duas vias frequentemente combinam-se originando compostos fenólicos com uma grande diversidade estrutural, como flavonoides, estilbenos, pironas e xantonas. Estes metabolitos são então designados como originários de uma via biossintética mista: via xiquimato e acetato. Por vezes, a combinação, pouco usual, de um terceiro precursor - o ácido mevalónico (via do ácido mevalónico) - com o ácido xiquímico ou com o acetato, dá origem a metabolitos do tipo quinona, furano ou piranocumarina, no primeiro caso, ou canabinoides no segundo. Estes três precursores juntos originam metabolitos como os rotenóides.<sup>25</sup> Concluindo, um composto fenólico é um composto cujos anéis aromáticos são formados principalmente a partir do metabolismo do ácido xiquímico, do acetato, ou de ambos, e não a partir de uma reação secundária após a sua origem.<sup>25</sup>

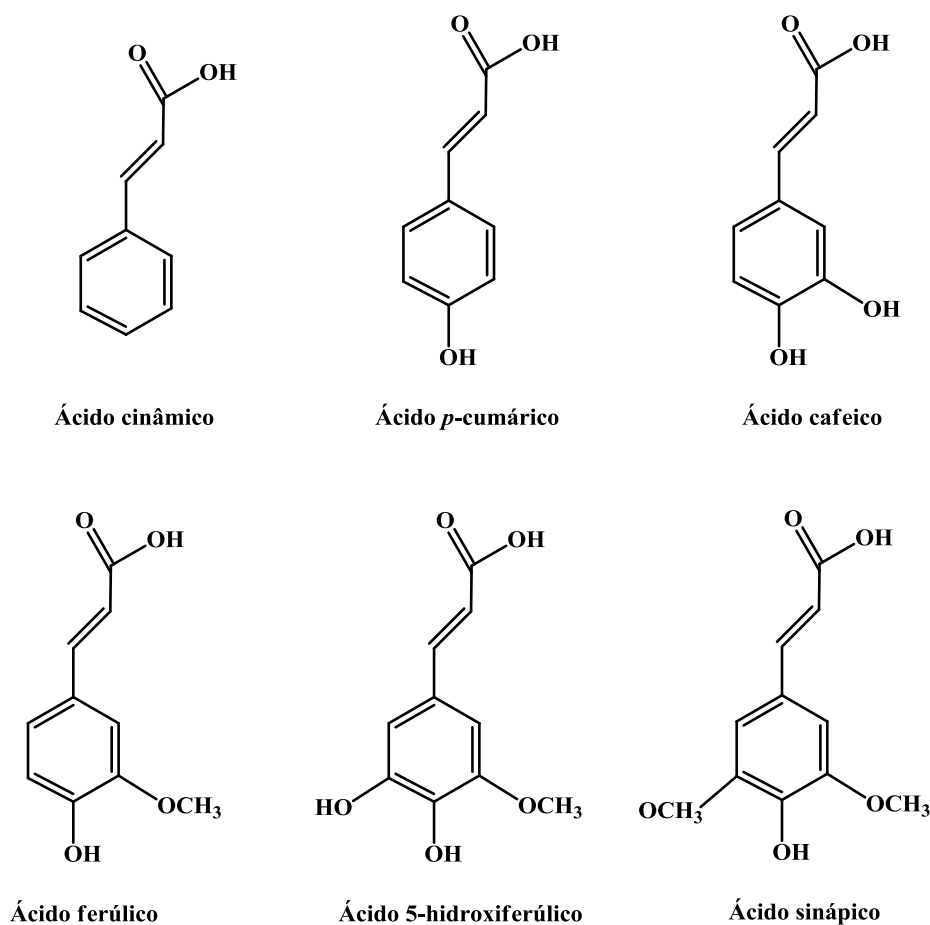
Os compostos fenólicos derivam de uma estrutura base comum (a unidade fenilpropanoide C6-C3), sendo os compostos estudados neste trabalho os ácidos

hidroxicinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), os ácidos hidroxibenzóicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e os flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>).<sup>27</sup>

### 1.2.1. Ácidos fenólicos

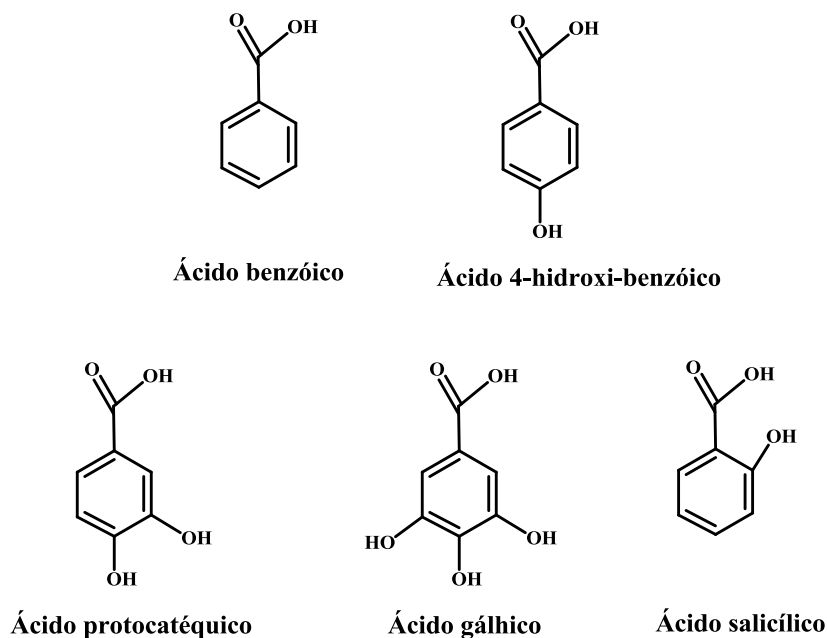
Os ácidos hidroxicinâmicos caracterizam-se por conterem uma estrutura base formada por um anel benzênico ligado a uma cadeia carbonada constituída por três carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Por seu lado, os ácidos hidroxibenzóicos apenas contêm na sua estrutura base um carbono ligado ao anel benzênico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>).<sup>28</sup> Estes metabolitos estão fisicamente dispersos por todos os órgãos das plantas (sementes, folhas, raízes e caules) e normalmente encontram-se combinados.<sup>29</sup>

Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são o ácido cinâmico, o ácido *p*-cumárico (ou cumárico), o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido 5-hidroxiferúlico e o ácido sinápico (**Figura 2**).<sup>30</sup>



**Figura 2.** Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos existentes na Natureza.

Alguns dos ácidos hidroxibenzoicos mais comuns são os ácidos benzoico, *p*-hidroxibenzoico (ou 4-hidroxibenzoico), salicílico, protocatéquico e gálico (**Figura 3**).

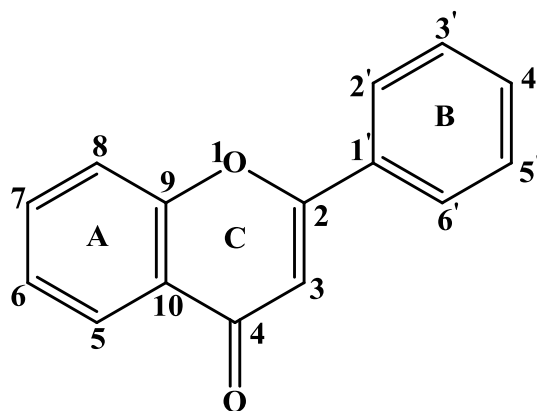


**Figura 3.** Exemplos de ácidos benzoicos existentes na Natureza.

### 1.2.2. Flavonoides

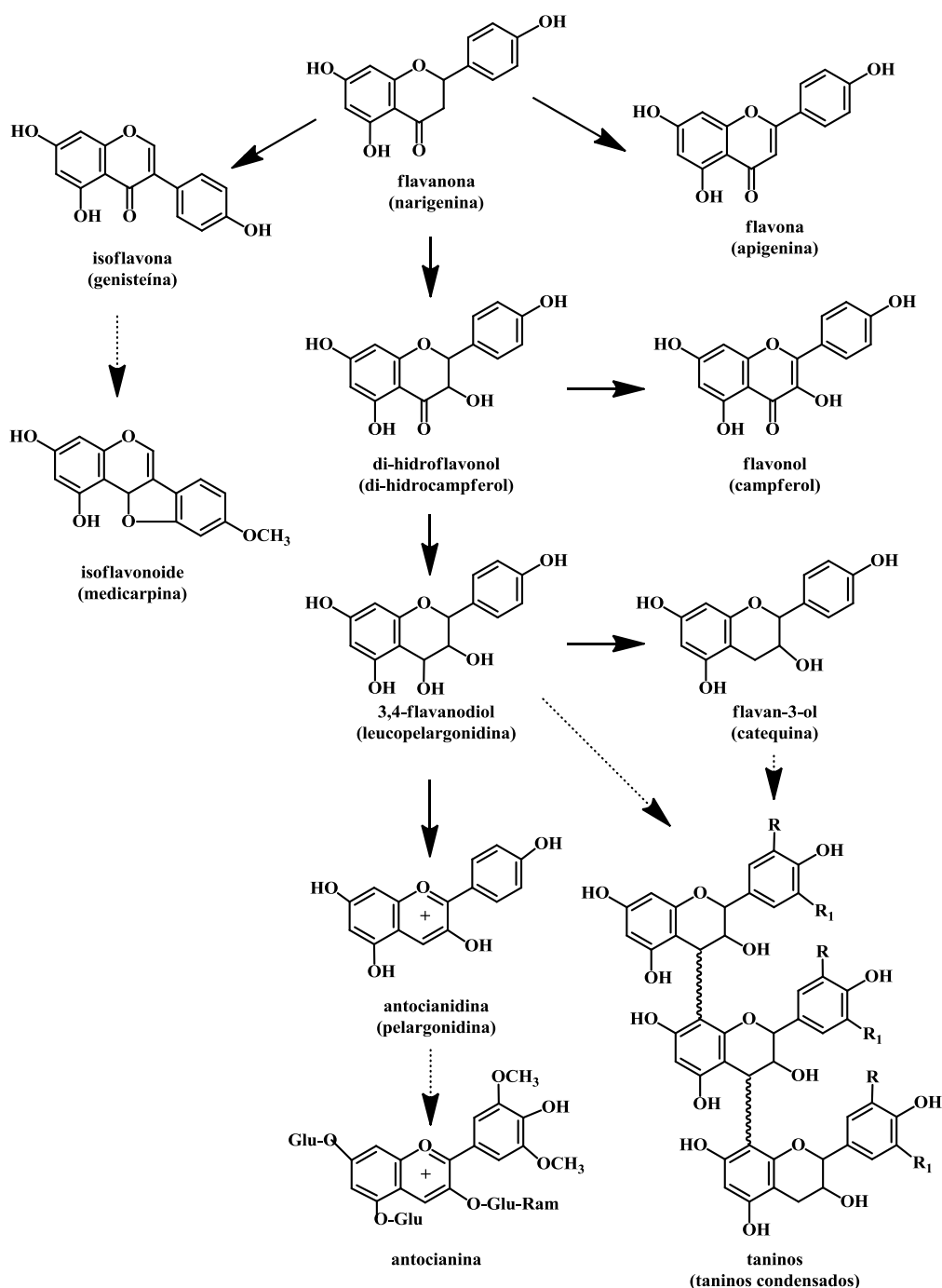
Os flavonoides constituem o grupo dos compostos fenólicos mais comum presente nas plantas, estimando-se em cerca de 9000 diferentes estruturas identificadas, número que, devido às técnicas cada vez mais sofisticadas de identificação de metabolitos naturais, tende a aumentar de ano para ano.<sup>31</sup> A sua estrutura base consiste em quinze átomos de carbono distribuídos numa configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Esta estrutura é denominada por uma unidade 2-fenilbenzopirano (**Figura 4**) e consiste essencialmente em dois anéis aromáticos A e B ligados por uma ponte constituída por três átomos de carbono, normalmente na forma de um anel heterocíclico C. O anel aromático A provém da via acetato/malonato e é

normalmente uma molécula *meta*-tri-hidroxilada; o anel aromático B resulta da via do ácido xiquímico e pode ser uma molécula mono-hidroxilada, *orto*-di-hidroxilada ou com tri-hidroxilação vicinal.<sup>28, 32</sup>



**Figura 4.** Estrutura geral dos flavonoides.

Baseado no grau de oxidação e saturação do anel heterocíclico C os flavonoides podem ser divididos em flavanonas, flavonois, flavonas, 3,4-flavanodiois (ou leucoantocianidinas), flavanois (ou flavan-3-óis), isoflavonas, di-hidroflavonois e antocianidinas.<sup>33</sup> A variedade de estruturas encontradas nas diferentes classes resulta de modificações posteriores, sendo a glicosilação e a metilação dos substituintes hidroxilos as mais comuns. Outras modificações, como metilação, metoxilação, hidroxilação adicional, formação de C-glicosilflavonoides, prenilação, acilação e dimerização surgem na natureza com menor frequência.<sup>34</sup> Na figura seguinte encontra-se esquematizado os subseqüentes metabolitos formados a partir da naringenina (**Figura 5**).



**Figura 5.** Biossíntese de flavonoides.<sup>33</sup>

Das diversas funções que os compostos fenólicos desempenham nas plantas destacam-se a proteção das plantas contra fatores bióticos e abióticos, em que atuam como agentes antimicrobianos, sinalizadores, alelopáticos, protetores da luz ultravioleta (UV) ou fazendo parte de componentes estruturais da planta.<sup>29, 31, 36-38</sup>

### 1.3. Métodos analíticos de separação

A investigação da relação estrutura-atividade, taxonomia e o controlo de qualidade de plantas e alimentos requer ferramentas rápidas e precisas para a determinação dos vários metabolitos que fazem parte da composição das matrizes em estudo. Atualmente as técnicas analíticas usadas que permitem a caracterização e quantificação de compostos fenólicos baseiam-se na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detetores ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (MS). Apesar deste último ser o detetor mais usado atualmente na identificação destes compostos, o detetor de díodos (DAD) é uma ferramenta indispensável para a caracterização inicial das diferentes estruturas fenólicas, uma vez que as diferentes classes possuem espectros de absorção ultravioleta-visível (UV-vis) característicos.<sup>17, 39</sup>

A cromatografia é um método de separação física em que os componentes a ser separados são seletivamente distribuído entre duas fases imiscíveis: uma fase móvel que flui através da fase estacionária. As diferentes variantes da técnica têm o nome do tipo de fase móvel usada: cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), ou cromatografia de fluidos supercríticos (SFC).

O processo de separação ocorre através de repetidas etapas de adsorção/desorção durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação deve-se às diferenças dos coeficientes de distribuição dos diferentes analitos na amostra.<sup>40</sup>

Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são utilizadas, como fase estacionária, colunas empacotadas com partículas de cerca de 3 a 10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diâmetro. A fase móvel é forçada a circular pela coluna através de uma bomba, gerando um fluxo constante muitas vezes a pressões superiores a 500 psi. Menores diâmetros de partícula levam a uma maior eficiência e a alta pressão possibilita períodos de análise mais curtos.<sup>41</sup>

A análise por cromatografia líquida de compostos fenólicos é geralmente realizada no modo fase reversa (RP). Neste modo, as colunas usadas como fase estacionária são apolares, constituídas por um empacotamento de sílica ligado a um polímero denominado octadecilsilano (ODS, RP-18 ou C18).<sup>42</sup> A separação depende da adsorção/desorção reversível das moléculas do soluto que contêm diferentes afinidades para com a fase

estacionária. A fase móvel usada é geralmente um sistema em gradiente constituído por água e metanol ou acetonitrilo como modificador orgânico. É frequente a adição de pequenas quantidades de ácido fórmico ou acético à fase móvel. Estes ácidos melhoram a separação, uma vez que reduzem a ionização dos grupos hidroxilo fenólicos.<sup>41,42</sup>

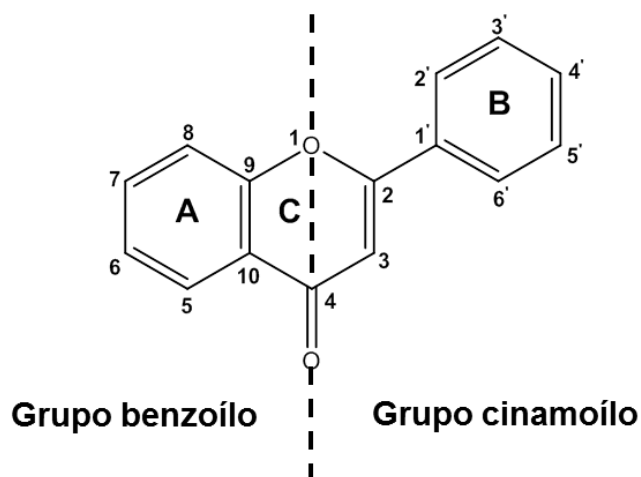
### 1.3.1. Métodos espectroscópicos

#### 1.3.1.1. Espectroscopia de UV-Vis

Uma característica dos compostos fenólicos de considerável benefício para a sua análise é o facto de possuírem pelo menos um anel benzénico, que, sendo um excelente cromóforo, absorve intensamente radiação UV, fornecendo informações estruturais consideráveis que podem distinguir o tipo de fenol e o seu padrão de oxidação.<sup>42</sup> A introdução de DAD acoplados à cromatografia líquida nos anos 80 permitiu a rápida e completa identificação e quantificação de matrizes complexas, uma vez que a deteção por DAD permite a obtenção dos dados cromatográficos a comprimentos de onda diferentes, permitindo desta forma que a quantificação seja feita ao comprimento de onda máximo de absorção de cada composto presente numa matriz.<sup>42</sup>

Os derivados do ácido benzóico apresentam um espectro de UV com um máximo de absorção entre 240 e 280 nm, enquanto os derivados do ácido cinâmico, devido à sua conjugação adicional, apresentam uma banda de absorção com máximos num intervalo mais amplo (de 270 a 360 nm).<sup>29</sup> Os flavonoides apresentam duas bandas de absorção características: a banda II, que se deve ao grupo benzoil (anel A), com um máximo entre 240 e 285 nm e a banda I com um máximo de absorção entre 300 e 550, que é atribuída à absorção por parte do grupo cinamoil (anéis B e C) (**Figura 6**).<sup>44, 45</sup> Estas bandas apresentam máximos de absorção típicos que caracterizam cada classe de compostos fenólicos existentes. Na **Tabela 1** encontram-se os máximos de absorção no UV de várias classes de compostos fenólicos.





**Figura 6.** Grupos responsáveis pelo surgimento de duas bandas de absorção no ultravioleta e visível.

**Tabela 1.** Máximos de absorção dos espectros de UV-Vis de várias classes de compostos fenólicos.<sup>39</sup>

Classe de compostos fenólicos	Banda de absorção II (nm)	Banda de absorção I (nm)
Derivados do ácido benzoíco	240-280	-
Derivados do ácido cinâmico	270-360	-
Flavonas	250-280	310-350
Flavonois	250-280	350-385
Flavanonas e di-hidroflavonois	275-295	300-330 Inflexão
Isoflavonas	245-275	310-330 Inflexão
Chalconas	230-270 (intensidade baixa)	340-390
Auronas	230-270 (intensidade baixa)	380-430
Antocianidinas e antocianinas	270-280	465-560

O padrão de hidroxilação da molécula afeta particularmente as bandas de absorção das flavonas e flavonois. O aumento do grau de oxigenação no anel B provoca um desvio batocrômico na banda I, que é tanto maior quanto maior for o número de substituições. O

padrão de oxidação do anel B influencia também a banda II, sendo visível a ocorrência de dois máximos de absorção em 3',4',5'-tri-hidroxi flavonas/ois, um máximo e uma inflexão para 3',4'-di-hidroxi flavonas/ois, e apenas um máximo em 4'-hidroxi flavonas/ois.<sup>29, 44</sup>

O aumento do grau de hidroxilação no anel A das flavonas e flavonois produz um efeito batocrômico considerável na banda II e um pequeno efeito na banda I (**Tabela 2**). A presença ou ausência do grupo hidroxilo na posição 5 provoca um efeito considerável na banda I e II do espectro de UV das flavonas e flavonois. Quando esse grupo hidroxilo está ausente, as duas bandas aparecem a comprimentos de onda menores que os equivalentes hidroxilados. Quando a molécula é hidroxilada nessa posição ocorre um efeito batocrômico na banda II de 6 a 17 nm e de 3 a 10 nm na banda I.<sup>44</sup>

**Tabela 2.** Banda II no espectro UV de flavonas contendo apenas oxidação no anel B.<sup>42</sup>

Hidroxilação da flavona	Absorvância da banda II (nm)
-	250
5	268
7	252
5,7	268
5,6,7	274
5,7,8	281

A metilação ou glicosilação dos grupos hidroxilo nas posições 3, 5 e 4' das flavonas ou flavonois provoca um desvio hipsocrômico, especialmente na banda I. A substituição do grupo hidroxilo na posição 3 provoca um desvio na ordem de 12-17 nm, podendo chegar a 22-25 nm para os flavonois que não contêm um grupo hidroxilo livre na posição 5. A substituição do grupo hidroxilo na posição 4' causa um desvio de 3-10 nm na banda I e finalmente a substituição do grupo hidroxilo na posição 5 provoca um desvio de 5-15 nm nas duas bandas de absorção do espectro de flavonas e flavonois. A substituição dos grupos hidroxilo em outras posições não afeta significativamente o espectro, enquanto a acetilação anula o efeito provocado pelo hidroxilo não acilado.<sup>44</sup>

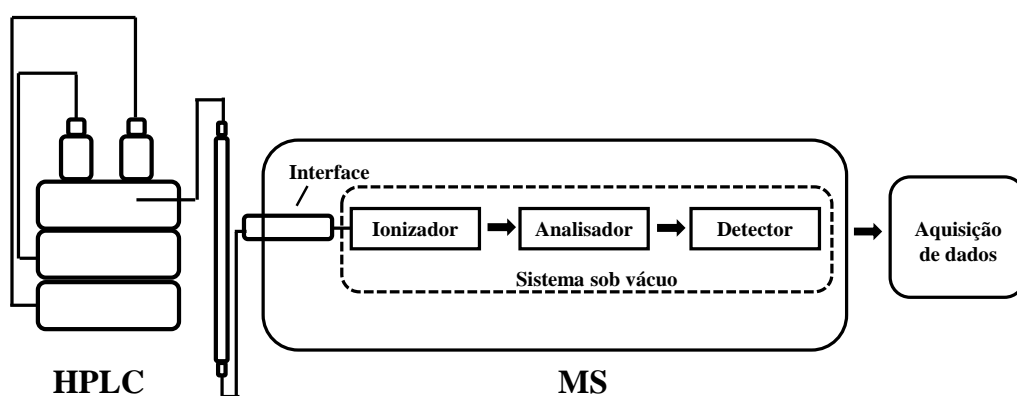
Recorrendo à cromatografia líquida acoplada a detetores DAD é possível discriminar os diferentes compostos fenólicos numa matriz complexa tendo em conta os

seus tempos de retenção e espectros de UV, comparando-os com compostos isolados autênticos, ou até mesmo recorrendo a base de dados. Contudo, essa informação por vezes não é suficiente, uma vez que existem compostos com estruturas e comportamento cromatográfico/absorção UV semelhante, levando muitas vezes a conclusões erradas. Será necessário então a utilização de um método de identificação mais sensível como a espectrometria de massa.

### 1.3.1.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica que produz (ioniza) iões moleculares e os seus fragmentos a partir de uma analito, analisa e deteta-os tendo em conta as suas massa moleculares [razão massa ( $m$ )/carga( $z$ )].<sup>46</sup> A ausência de necessidade de purificação e isolamento dos compostos fenólicos, particularmente flavonoides, a partir da mistura complexa em que se encontram e a utilização de apenas uma pequena quantidade dessa mesma amostra são as grandes vantagens da utilização da espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC/MS), uma vez que tornou possível uma caracterização estrutural mais rápida destes metabolitos.<sup>47, 48</sup>

Os sistemas de LC/MS são constituídos por quatro partes fundamentais (**Figura 7**): o cromatógrafo, uma fonte de ionização dos compostos previamente separados, um detetor de massa e um sistema de recolha de dados.



**Figura 7.** Esquema de um equipamento de HPLC/MS.

A maioria dos heterósidos de flavonoides são polares, não voláteis e muitas vezes termicamente lábeis. Os métodos de ionização convencionais, como o impacto eletrónico (EI) e a ionização química (CI), não são os mais adequados para a análise por MS destes compostos uma vez que necessitam que os compostos se encontrem na fase gasosa para proceder à sua ionização, que neste tipo de compostos poderá levar à sua degradação. O uso da derivatização, transformando estes compostos em derivados mais voláteis, torna difícil a interpretação dos seus espectros de massa. Com a introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como por exemplo a ionização por *electrospray* (ESI) ou a ionização química a pressão atmosférica (APCI), foi possível proceder à análise dos compostos fenólicos sem a necessidade de derivatização e evaporação dos analitos.<sup>33, 42, 47</sup> Estas técnicas são métodos de ionização suaves e não produzem muitos fragmentos, o que nem sempre permite uma boa elucidação estrutural. Esta desvantagem é ultrapassada com a utilização da dissociação por colisão induzida (CID) em que a fragmentação é induzida na região de passagem do ião da fonte para o analisador de massa, obtendo-se desta forma um método simples de MS-MS (fragmentação de iões e análise da razão  $m/z$  de iões produto obtidos dessa mesma fragmentação), que fornece alguma informação inicial antes de recorrer à fragmentação induzida nos analisadores de massa.<sup>42, 49</sup>

Atualmente o método de ionização mais usado para a análise por LC-MS de flavonoides é a ionização por ESI.<sup>49</sup> Nesta técnica, é aplicado um potencial elevado a um capilar muito estreito por onde flui o eluente, originando um nevoeiro de gotículas carregadas. Os iões são pré-formados na solução, ocorrendo depois a dessolvatação e fissão das gotículas, essencial para a formação de iões na fase gasosa. Os iões são depois filtrados para o analisador de massa.<sup>50</sup> Esta ionização pode ser efetuada no modo negativo (NI) ou no modo positivo (PI). O modo NI é usado em detrimento do modo PI, uma vez que os iões fenolato formados por NI são mais estáveis. Adicionalmente o modo NI é mais sensível. No modo positivo, o ruído é bastante alto, impossibilitando a deteção de alguns compostos.<sup>50, 51</sup> Uma possível explicação para o baixo sinal de flavonoides no modo positivo é o facto de estes, por não conterem átomos de azoto, apresentam uma baixa basicidade, não se formando facilmente catiões.<sup>51</sup>

Atualmente os analisadores de massa mais usados em LC-ESI-MS são analisador por armadilha de iões (“Ion-Trap”), o triplo quadrupolo e sistemas híbridos. Uma armadilha de iões é uma combinação de campos elétricos ou magnéticos que capta os iões

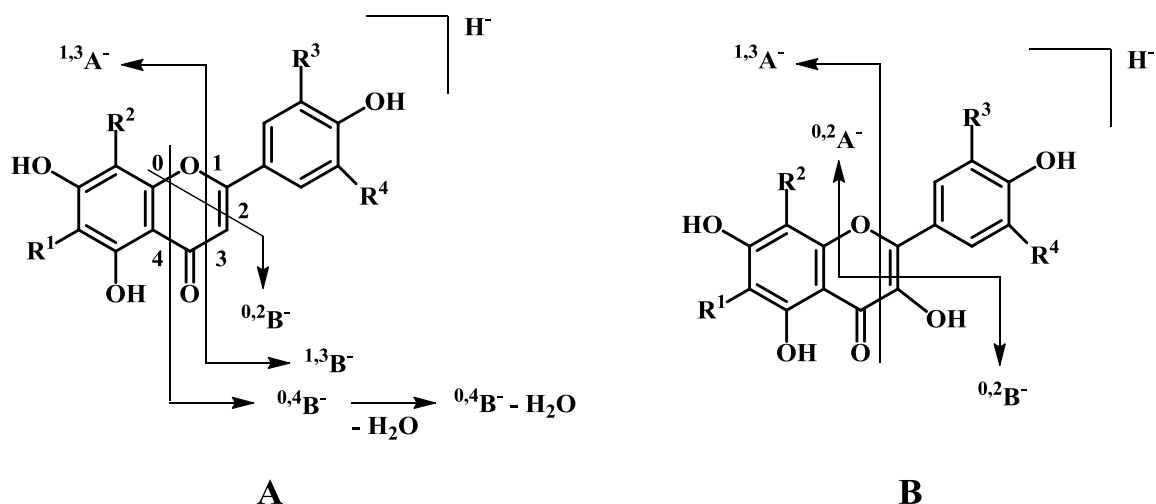
numa região de um sistema de vácuo. Neste analisador, os íons produto gerados após dissociação por colisão induzida são separados e detectados. Adicionalmente, um dos íons produto pode ser selecionado e submetido a uma segunda fase de CID, obtendo-se assim íons produto de segunda geração. Este processo pode ser repetido inúmeras vezes, ocorre sequencialmente no tempo, mas no mesmo espaço, sendo possível determinar as relações íon precursor-íon produto (análise MS<sup>n</sup>).<sup>40, 51</sup>

#### 1.3.1.2.1. Elucidação estrutural de flavonoides e os seus glicósidos

Os padrões de fragmentação obtidos por espectrometria de massa fornecem, para além da massa molecular, informação estrutural da natureza da genina (ou aglicona), dos seus substituintes (como açúcares, grupos acilo e outros) e das ligações interglicosídicas, assim como a distribuição desses substituintes entre o anel A e B da genina.<sup>42</sup>

##### 1.3.1.2.1.1. Geninas

Na fragmentação das geninas pelo modo negativo utiliza-se uma nomenclatura proposta por Ma *et. al* (1997)<sup>52</sup>, em que as letras  $^{ij}A^-$  e  $^{ij}B^-$  representam os íons primários contendo os anéis A e B intactos. Os expoentes  $i$  e  $j$  representam as ligações do anel C que foram quebradas. Os principais fragmentos que resultam nos íons A e B são formados pela quebra das ligações C-C nas posições 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 e 2/4 do anel C (**Figura 8**). A fragmentação depende muito do padrão de substituição e da classe dos flavonoides estudados. Por exemplo, a presença de um grupo hidroxilo na posição 3 dos flavonóis resulta em mais e diferentes possibilidades de fragmentação do que no caso das flavonas.<sup>47</sup>



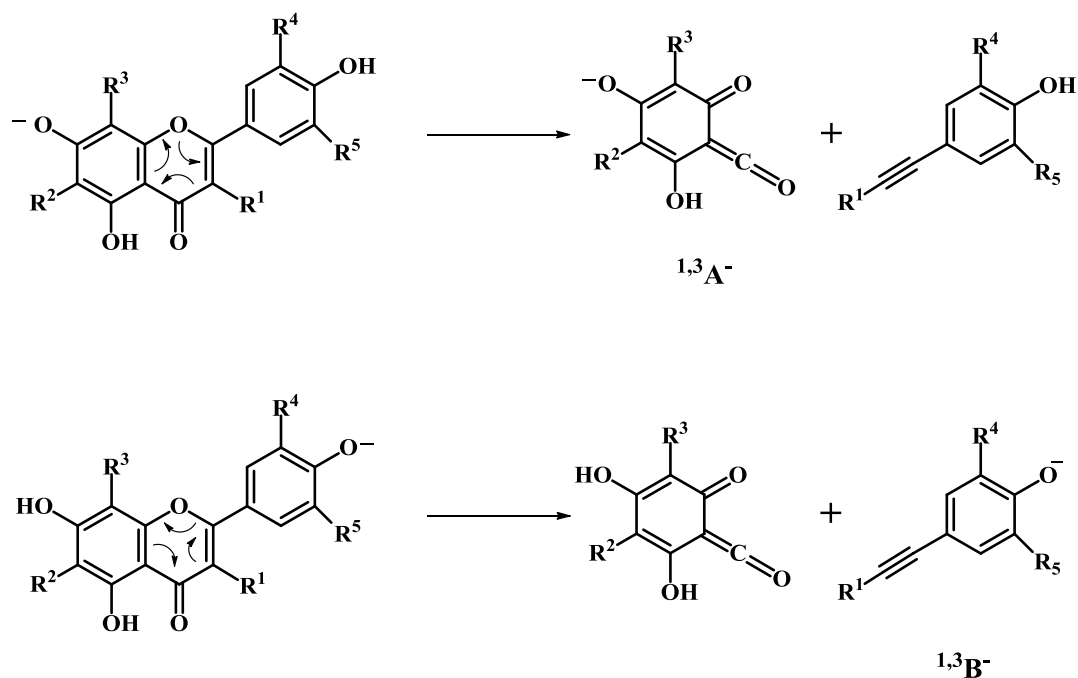
**Figura 8.** Nomenclatura de iões produto de diagnóstico de flavonas (A) e flavonóis (B). R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = H ou OH.<sup>52</sup>

Um dos mecanismos de fragmentação comum a flavonas e flavonóis é a fragmentação por retro-Diels-Alder (RDA). O fragmento <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> (**Figura 9**), obtido a partir desse mesmo mecanismo, é o fragmento mais abundante no espectro destes compostos. A RDA fornece informação relevante quanto ao grau de hidroxilação do anel A.<sup>53</sup>

O grau de hidroxilação do anel B é também relevante na fragmentação. Os flavonóis que contêm dois ou mais grupos hidroxilo no anel B originam a formação de iões [<sup>1,2</sup>A-H]<sup>-</sup> e [<sup>1,2</sup>B-H]<sup>-</sup>. Por outro lado, no caso em que o anel B não tem qualquer substituinte, a energia de colisão necessária para obter fragmentação é muito grande, levando à formação de muitos iões produto. Por vezes, pode também ser observada a quebra direta entre o anel B e o anel C, resultando no fragmento [M-B]<sup>-</sup>.<sup>54, 55</sup>

Perdas sucessivas de pequenas moléculas neutras como CO [28 unidades de massa atômica (amu)], CO<sub>2</sub> (34 amu) e C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (42 amu) são também características nos espectros de massa de flavonóis e flavonas.

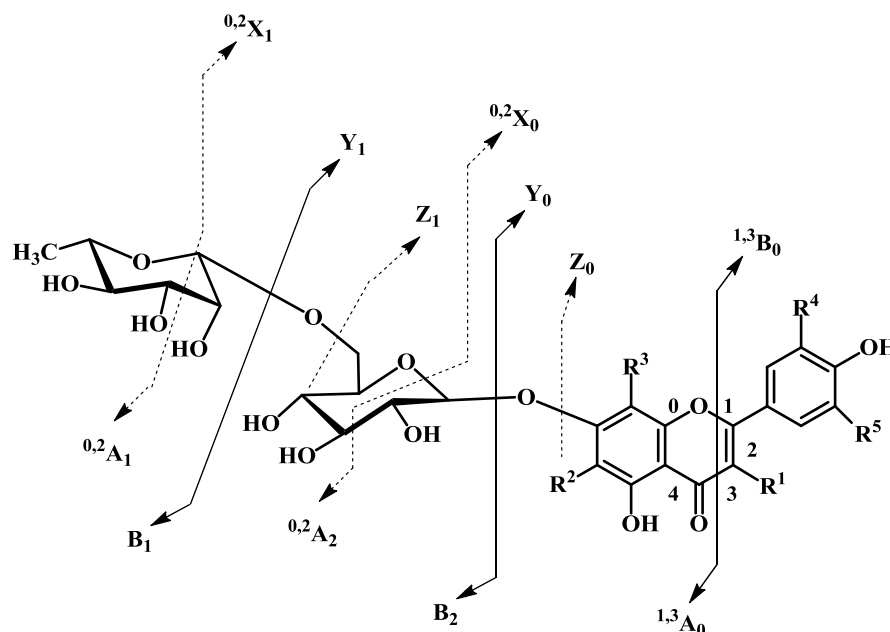
Os flavonoides metilados caracterizam-se por apresentarem uma fragmentação de 15 amu, resultando um ião [M-H-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> que é geralmente o pico base.<sup>47</sup>



**Figura 9.** Iões produto de diagnóstico de flavonas (R<sub>1</sub>=H) e flavonóis (R<sub>1</sub>=OH) formados pela fragmentação por retro-Diels-Alder (RDA). R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = H ou OH.<sup>53, 56</sup>

#### 1.3.1.2.1.2. Flavonoides *O*-glicósidos, *C*-glicósidos e *O,C*-glicósidos

A nomenclatura de classificação dos iões glicosídicos de flavonoides foi proposta por Domon e Costello (1988)<sup>57</sup> (**Figura 10**). Desta forma, os iões contendo a genina são denominados <sup>k,l</sup>X<sub>j</sub>, Y<sub>j</sub> e Z<sub>j</sub>, onde *j* corresponde ao número da ligação interglicosídica quebrada, contando a partir da genina, e os expoentes *k* e *l* indicam as quebras no anel dos açúcares. A ligação glicosídica entre a genina e o açúcar tem o número 0. Quando a carga fica retida neste último, os fragmentos são designados <sup>k,l</sup>A<sub>i</sub>, B<sub>i</sub> e C<sub>i</sub>, onde *i* corresponde ao número da ligação glicosídica quebrada, contando a partir da parte não reduzida.<sup>57</sup>



**Figura 10.** Nomenclatura usada para os iões de glicósidos de flavonas ( $R^1=H$ )/flavonois ( $R^1=OH$ ).  $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$  ou  $OH$ .<sup>45</sup>

Os iões *O*-glicósidos, *C*-glicósidos e *O*-*C*-glicósidos podem ser distinguidos tendo em conta os seus iões de primeira ordem. No espectro de *C*-glicósidos, apenas o ião precursor  $[M-H]^-$  é observado. No espectro de *O*,*C*-di-glicósidos também se observa o ião  $Y_1^-$ , sendo a sua intensidade muito baixa, observando-se no entanto um ião produto  $[Y_1-H_2O]^-$  abundante, enquanto no espectro de flavonoides di-*O*,*C*-glicósidos o ião  $Y_1^-$  tem uma intensidade superior a 90%. Já no espectro de *O*-glicósidos é possível observar-se os iões  $Y_0^-$  e  $Y_1^-$  (quando se trata de um dissacarídeo).<sup>47</sup>

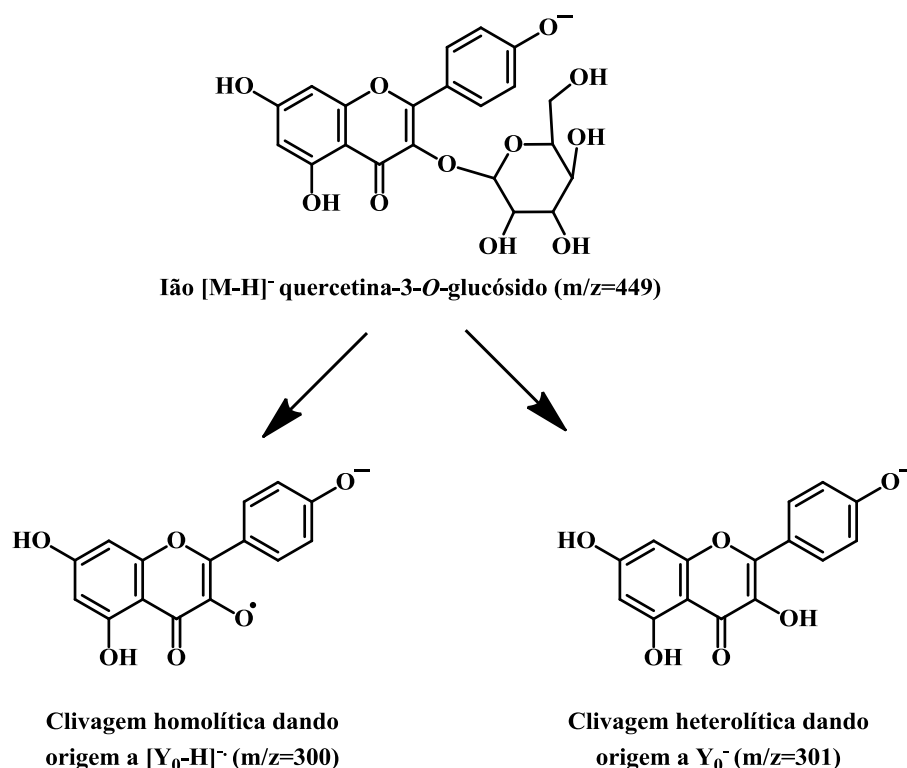
## Flavonoides *O*-glicósidos

A espectrometria de massa fornece informação quanto à sequência dos açúcares ligados à genina, assim como ao tipo dessa mesma genina. A posição da ligação dos oligossacarídeos à genina, a posição da ligação interglicosídica e a identidade estereoquímica do resíduo terminal podem também ser observados.



A informação relativa à sequência dos açúcares ligados à genina é dada pelas quebras características do ião Y resultante da fragmentação da ligação osídica, que origina perdas de 162 amu para as hexoses, 146 amu para as desoxi-hexoses e 132 amu para as pentoses.<sup>47, 58</sup>

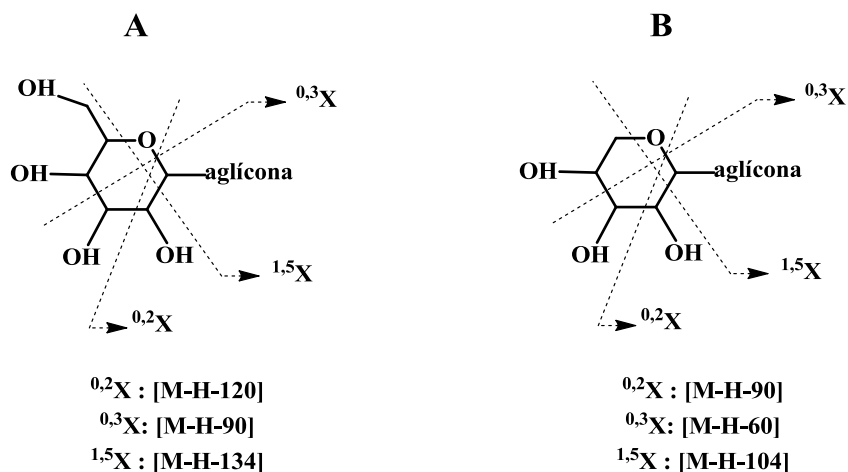
Segundo Hvattum e Ekeberg (2003),<sup>59</sup> a CID de flavonoides *O*-glicosídeos produzem o fragmento  $Y_0^-$  por clivagem heterolítica, e o radical  $[Y_0-H]^-$  por clivagem homolítica (**Figura 11**). A razão entre a intensidade do fragmento  $[Y_0-H]^-$  e do fragmento  $Y_0^-$  formados a partir da clivagem da ligação 3-*O*-glicosídica dos flavonoides glicosilados é tanto maior quanto maior for o número de substituintes hidroxilo existentes no anel B. Essa mesma razão resultante da quebra da ligação 7-*O*-glicosídica nas flavonas glicosiladas é tanto menor quanto maior for o número de substituintes hidroxilo existentes no anel B. Adicionalmente, quando a flavona 7-*O*-glicosídeo contém um substituinte metoxilo no anel B, não há a formação do radical.<sup>59</sup>



**Figura 11.** Formação dos radicais  $[Y_0-H]^-$  e  $Y_0^-$  por clivagem homolítica e heterolítica, respectivamente.<sup>59</sup>

Fragmentos com razão  $m/z$  290 e 306, formados a partir da eliminação de uma molécula de água do ião produto B<sub>2</sub> foram detetados por Sakushima *et al.* (1989)<sup>57</sup> em flavonoides *O*-glicosilados contendo ligações interglicosídicas 1→6, enquanto estes iões não se observam para os seus análogos 1→2.<sup>47, 60</sup>

Nos flavonoides C-glicosilados o açúcar encontra-se diretamente ligado ao núcleo da genina *via* uma ligação C-C resistente a hidrólise ácida. Por esse motivo, o espectro de massa de primeira ordem destes compostos apenas fornece a massa molecular destes. As mais importantes vias de fragmentação destes compostos são as quebras no anel do açúcar (**Figura 12**) e a perda de moléculas de água.



**Figura 12.** Iões produto característicos formados a partir de clivagens nos resíduos hexose (**A**) e pentose (**B**).<sup>47</sup>

Atualmente, apenas são conhecidos flavonoides C-6 e/ou C-8-glicósidos, logo o desafio principal será o de poder diferenciá-los através dos seus espectros de massa. Becchi e Fraisse (1989)<sup>60</sup> e Li *et al.* (1992)<sup>62</sup> observaram que a perda de uma molécula de água pelo ião  $[M-H]^-$  origina um ião que apresenta uma maior intensidade nos espectros de 6-C-glicósidos do que nos de 8-C-glicósidos. Para além disso, o ião  $^{0,3}X^-$  ( $[M-H-90]^-$ ) é mais abundante nos espectros dos flavonoides 6-C-glicosilados do que nos espectros dos seus isómeros 8-C-glicosilados.<sup>63</sup>

Alguns dos pressupostos descritos acima foram estabelecidos usando técnicas de ionização suaves mais antigas como o FAB ou LSIMS, no entanto também se aplicam a técnicas atuais como a ESI e APCI, uma vez que o comportamento de fragmentação das espécies de iões moleculares gerados com estas técnicas ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M-H]^-$ ) é o mesmo.<sup>47</sup> Estes pressupostos constituem uma ferramenta importante na caracterização inicial de compostos fenólicos por MS, orientando o analisador na definição de uma elucidação estrutural mais completa.

#### **1.4. Espécies reativas de oxigénio (ROS)/azoto (RNS) e *stress* oxidativo**

Os radicais livres podem ser definidos como espécies que contêm um ou mais eletrões de valência desemparelhados, sendo por isso espécies altamente reativas, uma vez que necessitam de eletrões para preencher a orbital, ficando dessa forma estáveis.<sup>64, 65</sup>

Estas espécies podem ser geradas por processos exógenos como as radiações UV, raios-X ou raios-gama, assim como pelo ozono (O<sub>3</sub>), pesticidas ou xenobióticos. São também produtos normais do metabolismo celular, geradas por uma variedade de processos fisiológicos, das quais se destacam a respiração celular, sinalização celular, reações de destoxificação envolvendo o citocromo P450, produção por neutrófilos e macrófagos em processos de inflamação.<sup>65</sup>

As espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) são reconhecidas por desempenharem um duplo papel, sendo tanto benéficas como prejudiciais para os organismos vivos.<sup>66</sup> Em condições fisiológicas normais existe um equilíbrio (de oxidação-redução) entre estas espécies pró-oxidantes e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes nas células; contudo, a quebra deste equilíbrio, isto é, quando há uma produção exagerada de ROS/RNS ou uma deficiente presença de antioxidantes, leva a um estado denominado *stress* oxidativo/nitrosativo. Nestas condições, as ROS/RNS poderão reagir com biomoléculas importantes, inibindo o seu normal funcionamento. Tendo em conta os aspetos referidos, poder-se-á concluir que o *stress* oxidativo e nitrosativo estão implicados em inúmeras doenças.<sup>66, 67</sup>

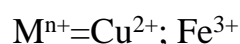
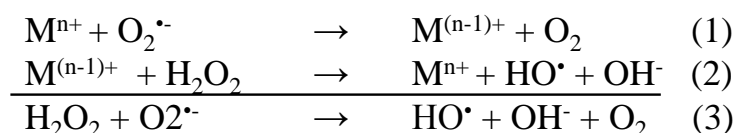
##### **1.4.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS)**

Os radicais que derivam do oxigénio representam a classe mais importante de espécies radicalares geradas nos sistemas vivos.<sup>66</sup> O conceito de “espécies reativas de oxigénio” é mais amplo e abrange não apenas os radicais livres de oxigénio mas também espécies químicas não radicalares com potencial oxidante.<sup>68</sup>

A formação do radical anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ocorre principalmente na mitocôndria, onde é gerado quando ocorre a redução (doação de um eletrão) do oxigénio molecular (O<sub>2</sub>), sendo a respiração celular, mais precisamente a cadeia transportadora de

eletrões mitocondrial, a principal fonte deste radical. Adicionalmente, este radical é também formado durante a atividade de várias enzimas, como a NAD(P)H oxidase (NOX), cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) ou xantina oxidase (XO).<sup>66, 69</sup> Este radical, apesar de ser bastante reativo, não reage diretamente com polipéptidos, açúcares ou ácidos nucleicos. A toxicidade deste radical deve-se ao fato de gerar outras espécies mais reativas.<sup>70</sup>

Em condições fisiológicas normais, não existe nenhum íão metálico de ferro intracelular livre. Contudo, sob condições de *stress*, um excesso de  $O_2^{\bullet-}$  liberta o íão ferro ( $Fe^{2+}$ ) de moléculas contendo este metal. O  $Fe^{2+}$  libertado participa numa reação com o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) denominada de reação Fenton, originando o radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) altamente reativo.<sup>66, 71</sup> O  $H_2O_2$  é também formado pela cadeia transportadora de eletrões através da redução do  $O_2$  (doação de dois eletrões) ou pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ . Este peróxido difunde facilmente pelas células, causando uma variedade de perturbações.<sup>72</sup>



**Equação 1 e 2.** Reações de Fenton

**Equação 3.** Reação de Haber-Weiss

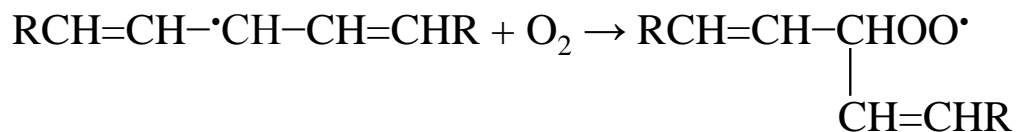
O  $\cdot OH$  pode também ser gerado a partir da decomposição de água ( $H_2O$ ) por radiação ionizante. Adicionalmente, este radical é também formado pela decomposição fotolítica de hidroperóxidos alquilados.<sup>70</sup> Este radical está envolvido em vários processos metabólicos celulares como, por exemplo, inflamação, morte celular ou morte de microrganismos em reações de defesa contra agentes patogénicos. Estes efeitos devem-se à capacidade do  $\cdot OH$  para danificar o DNA, proteínas ou lípidos membranares.<sup>73</sup> Estes últimos e outras moléculas orgânicas insaturadas podem sofrer auto-oxidação, um processo que precede uma reação em cadeia em que se formam radicais peroxilo ( $ROO\cdot$ ), a qual tem

a denominação de peroxidação lipídica.<sup>74</sup> Estes peróxidos são formados quando uma espécie reativa de oxigénio é suficientemente reativa para abstrair um hidrogénio (H) alílico de um átomo de carbono situado entre duas ligações duplas. O  $\cdot\text{OH}$  inicia esta reação.<sup>74, 75</sup>



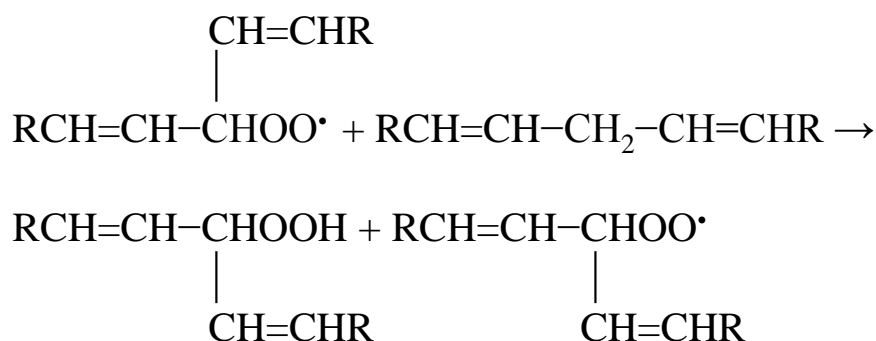
#### **Equação 4. Iniciação**

Em condições aeróbias, o radical  $\cdot\text{CH}$  formado reage com o  $\text{O}_2$  dando origem a um radical peroxilo:



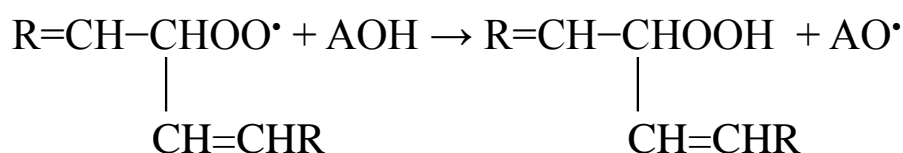
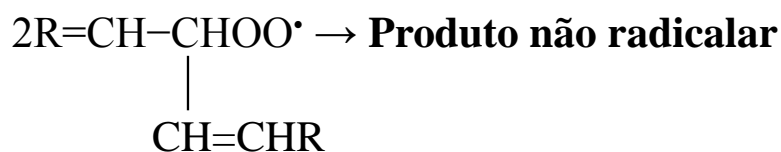
#### **Equação 5. Propagação**

Este radical tem a capacidade de abstrair um hidrogénio de uma molécula adjacente, formando-se um novo radical que irá reagir novamente com o  $\text{O}_2$  e gerar um novo radical peroxilo, induzindo uma reação em cadeia.<sup>75, 76</sup>



#### **Equação 6. Propagação**

Esta reação em cadeia termina quando dois radicais reagem entre si e formam uma molécula não radicalar, ou quando o radical reage com uma outra molécula com capacidade antioxidante, formando-se um radical menos reativo.<sup>74, 75</sup>



#### Equação 7. Finalização (A= antioxidante)

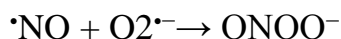
Estes radicais hidroperóxidos altamente reativos, que poderão comprometer a viabilidade das membranas celulares, estão envolvidos na fragmentação do DNA e em modificações estruturais de proteínas.<sup>75, 77</sup> Adicionalmente, devido à elevada instabilidade destas espécies, podem ser decompostos em aldeídos, cetonas e outros compostos reativos e igualmente deletérios.<sup>74</sup> De facto, vários estudos indiciam que a peroxidação está ligada a várias doenças como cancro, doenças neurodegenerativas, aterosclerose e doenças inflamatórias.<sup>78</sup>

O oxigénio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) é uma ROS não radicalar, provavelmente formado *in vivo* em tecidos expostos à luz. Esta espécie interage com outras moléculas transferindo a sua energia de excitação ou combinando-se com as moléculas. Os alvos de preferência do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> são as ligações duplas de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ou a base azotada do DNA guanina.<sup>79</sup>

O ácido hipocloroso (HOCl) é um oxidante muito reativo formado pelos fagócitos em situações de defesa do organismo. Este metabolito interage com os componentes da membrana celular, oxidando grupos sulfidrílo do plasma membranar e perturbando funções celulares como os transportadores de aminoácidos e glucose, assim como a capacidade de bombas de potássio.<sup>72</sup>

### 1.4.2. Espécies reativas de azoto (RNS)

O radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) é um oxidante muito importante uma vez que atua como sinalizador em diversos processos fisiológicos, como a neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento do músculo liso, mecanismos de defesa e regulação do sistema imunitário.<sup>70, 80-82</sup> Este radical é produzido numa reação catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS) que converte L-arginina a  $\cdot\text{NO}$  e L-citrulina. Embora sejam atribuídos muitos efeitos tóxicos ao  $\cdot\text{NO}$ , estes são muito provavelmente provocados pelos seus produtos de oxidação.<sup>81</sup> O  $\cdot\text{NO}$  quando formado difunde rapidamente através dos tecidos celulares para as células sanguíneas onde é rapidamente convertido em ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Este facto limita o tempo de semivida deste radical *in vivo*. Contudo, quando este radical se forma muito próximo do local onde ao mesmo tempo se está a formar o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , estes irão combinar-se espontaneamente dando origem a um produto mais reativo, o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).<sup>81</sup>



#### **Equação 8.** Formação do anião peroxinitrito.

Este ião é um oxidante muito forte que provoca a fragmentação do DNA, a inibição de enzimas, a oxidação lipídica, a oxidação e nitração proteica, quer por oxidação direta, ou gerando radicais ainda mais reativos.<sup>70, 81</sup>

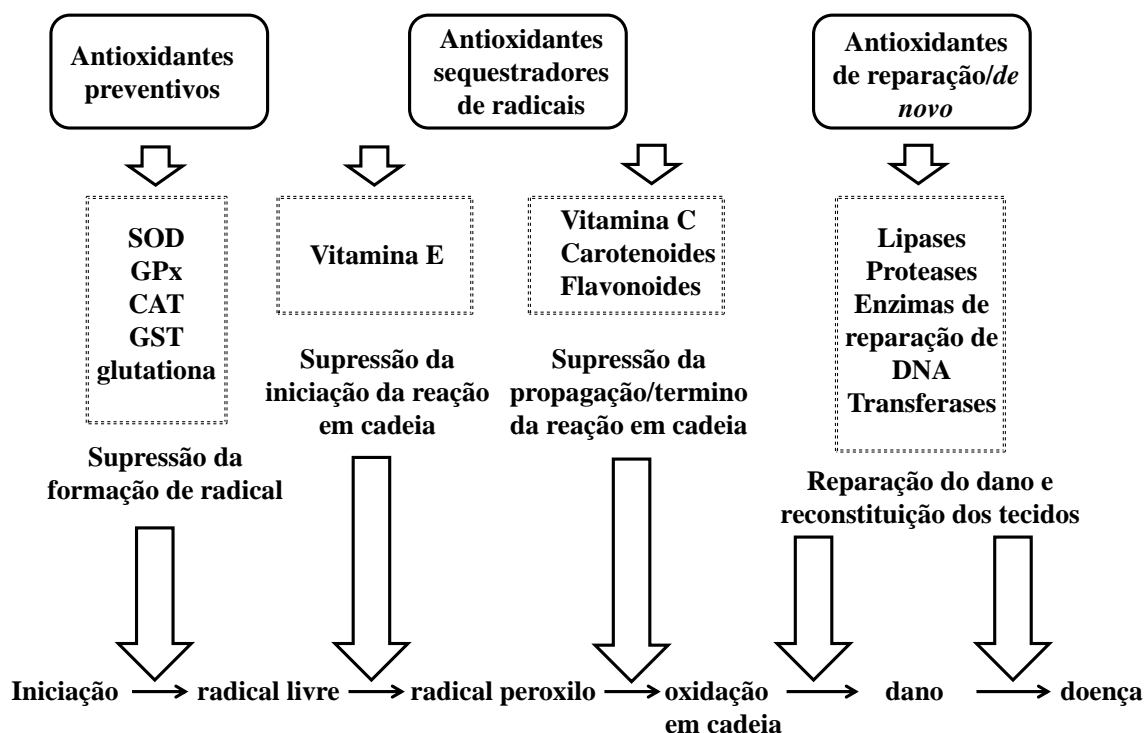
O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a formação de radicais livres, dando origem ao *stress* oxidativo/nitrosativo está associado a diferentes patologias como doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e Parkinson), doenças degenerativas como a aterosclerose, *diabetes mellitus*, doenças inflamatórias (artrite reumatoide, pancreatite, inflamação intestinal), carcinogénese, hipertensão, doenças pulmonares e hematológicas.<sup>83</sup>



### 1.4.3. Mecanismos de defesa antioxidante

Um agente antioxidante é uma substância que, quando presente em concentrações baixas relativamente a um substrato oxidável, previne ou retarda a oxidação desse substrato.<sup>68</sup> Quando os radicais livres são formados *in vivo*, muitos antioxidantes protegem os sistemas vivos do *stress* oxidativo/nitrosativo. Estes podem intervir nos três maiores passos do processo oxidativo originado pelos radicais livres: iniciação, propagação e terminação.<sup>83</sup>

Na primeira linha de defesa, os antioxidantes preventivos suprimem a formação de radicais livres. Quando esta linha de defesa não é suficiente, outros antioxidantes que sequestram diretamente os radicais livres tentam impedir a iniciação da cadeia oxidativa, prevenindo desta forma a propagação da cadeia. As enzimas de reparação e *de novo* atuam como a terceira linha de defesa reparando o dano causado pelos radicais livres e reconstituindo as membranas celulares.<sup>64</sup> A **Figura 13** descreve esquematicamente os vários tipos de antioxidantes e suas funções.



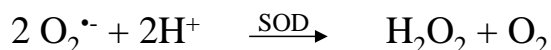
**Figura 13.** Grupos de agentes antioxidantes e suas ações. SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; GST: glutathione-S-transferase.<sup>64</sup>

Os agentes antioxidantes podem também ser classificados de acordo com a sua natureza como endógenos ou exógenos. As enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) são os principais agentes antioxidantes enzimáticos endógenos primários, metabolizando intermediários oxidantes tóxicos. Estas enzimas podem eliminar diretamente as espécies reativas, enquanto a glutathione reductase (GR) e a glutathione-S-transferase (GST) são enzimas secundárias endógenas que atuam na destoxificação de radicais livres, diminuindo os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou mantendo os níveis de intermediários metabólicos como a glutathione (GSH) ou a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).<sup>64, 84</sup>

Os agentes antioxidantes exógenos são obtidos geralmente da dieta, sendo a vitamina C (ácido ascórbico),  $\alpha$ -tocoferol (um dos constituintes da vitamina E), o  $\beta$ -caroteno e os compostos fenólicos os mais importantes.<sup>64, 83</sup> Os mecanismos de ação de alguns dos agentes antioxidantes referidos serão abordados de seguida em mais pormenor.

#### **1.4.3.1. Agentes antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos)**

A enzima superóxido dismutase é um agente antioxidante que catalisa a dismutação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{O}_2$  e na espécie menos reativa  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta enzima necessita de metais de transição como cofatores. O seu substrato é o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que destrói por sucessivas oxidações e reduções do metal de transição existente no centro ativo, num mecanismo tipo “ping-pong”.<sup>70</sup>

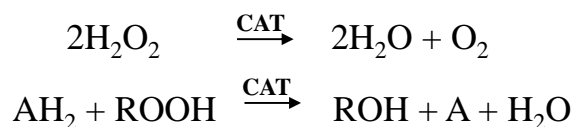


**Equação 9.** Reação catalisada pela SOD.

No corpo humano existem três isoformas da SOD: a citosólica (Cu, Zn-SOD), a mitocondrial (Mn-SOD) e a extracelular (EC-SOD).<sup>70</sup>

A catalase é uma enzima presente nas células de plantas, animais e bactérias aeróbias. Esta enzima está localizada num organelo da célula denominado peroxissoma e

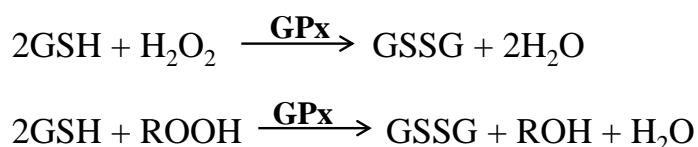
promove eficientemente a conversão de  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Adicionalmente esta enzima também catalisa a reação de doadores de hidrogénio (H) com atividade peroxidante.<sup>70</sup>



**Equação 10.** Reações catalisadas pela CAT.

Existem duas formas da enzima glutathione peroxidase, uma é selénio-independente [glutathione-S-transferase (GST)], sendo a outra forma selénio-dependente [glutathione peroxidase (GPx)]. Estas duas enzimas diferem no número de subunidades, na natureza da ligação do selénio ao centro ativo e no mecanismo catalítico.<sup>70</sup>

No sistema metabólico humano existem quatro GPx diferentes. Todas estas enzimas reduzem peróxidos, potenciais substratos de reações de Fenton, originando selenonas (Se-OH). As GPx atuam juntamente com a glutathione [ $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine (GSH)], um antioxidante não enzimático que está presente nas células em concentrações consideráveis [da ordem dos micromolar ( $\mu M$ )]. O substrato da reação catalítica da GPx é o  $H_2O_2$  ou peróxidos orgânicos (ROOH). Os peróxidos são decompostos a  $H_2O$  (ou álcool), oxidando simultaneamente GSH.<sup>70</sup>



**Equação 11.** Reações catalisadas pela GPx.

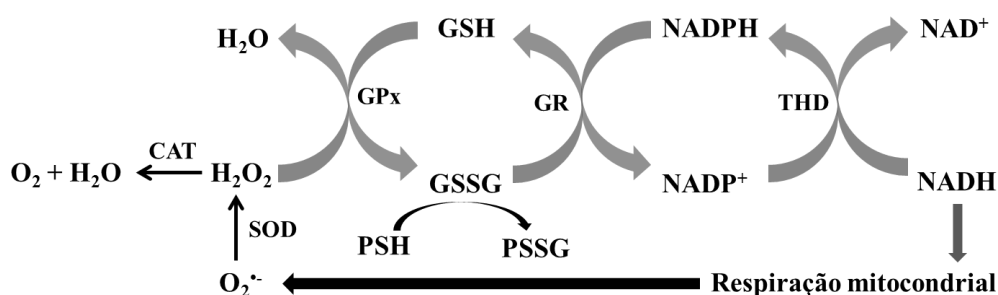
As enzimas GPx constituem a defesa antioxidante enzimática mais importante contra níveis baixos de *stress* oxidativo. A glutathione oxidada (GSSG) é posteriormente reduzida a GSH pela ação da glutathione reductase, que usa NADPH como cofator.

A GSH atua também em conjunto com as GST na destoxificação de eletrófilos xenobióticos endógenos, originando conjugados de glutathione (GSR).<sup>84</sup>



**Equação 12.** Reações catalisadas pela GST.

Para além de participar nos processos metabólicos que envolvem a GPx, GST e outras enzimas, a GSH participa no transporte de aminoácidos pelo plasma membranar, mantém o estado redox de proteínas sulfidrilo (proteína-SH), muito importantes na reparação e expressão do DNA, sequestra diretamente o  $\cdot\text{OH}$  e  $^1\text{O}_2$  e atua na regeneração de outros agentes antioxidantes importantes, como as vitaminas C e E.<sup>70</sup> A **Figura 14** descreve de uma forma esquematizada as funções da glutathione (ciclo da glutathione).



**Figura 14.** Ciclo de oxidação-redução da glutathione, NADPH (fosfato de dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida e adenina na forma reduzida) e NADH (dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida e adenina na forma reduzida) na matriz mitocondrial. CAT: catalase; GSH: glutathione; GSSG: glutathione oxidada; SOD: superóxido dismutase; PSH: proteína sulfidrilo; PSSG: proteína-glutathione; THD: transhidrogenase.<sup>85</sup>

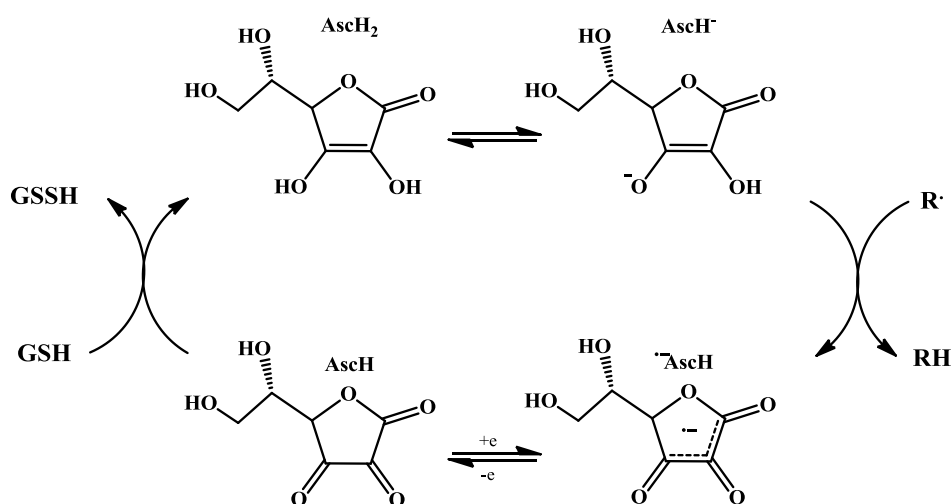
### 1.4.3.2. Agentes antioxidantes exógenos

O ácido ascórbico (vitamina C) é um composto com características hidrofílicas obtido através da dieta. A sua tendência para se acumular nos tecidos poderá explicar o seu papel antioxidante. Este composto possui a capacidade de sequestrar ou neutralizar uma grande variedade de ROS, como o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), radicais peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), radicais alcóxido ( $\text{RO}\cdot$ ), radical anião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperoxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ), ácido

hipocloroso (HOCl), ozono (O<sub>3</sub>), e RNS, como o anião peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>) ou o dióxido de azoto (NO<sub>2</sub>),<sup>86</sup> contribuindo desta forma para a proteção contra lesões pancreáticas, cânceros estomacais, pulmonares e do cólon.<sup>70</sup>

O ácido ascórbico (AscH<sub>2</sub>) em condições fisiológicas encontra-se na forma de anião ascorbato (AscH<sup>-</sup>) e no sequestro radicalar doa um elétron à espécie radicalar livre, originando o radical anião semidesidroascorbato (Asc<sup>•-</sup>), menos reativo. Este radical poderá novamente ser reduzido a ascorbato pela ação da glutathiona (**Figura 15**).<sup>70, 87</sup>

Adicionalmente, o ácido ascórbico também amplifica a ação de outros agentes antioxidantes, uma vez que consegue regenerar os radicais α-tocoferilo, o urato e o cátion radicalar do β-caroteno.<sup>88</sup>



**Figura 15.** Sequestro de espécies reativas por parte do ácido ascórbico e sua regeneração pela glutathiona. AscH<sub>2</sub>: ácido ascórbico; AscH<sup>-</sup>: ascorbato; Asc<sup>•-</sup>: radical anião semidesidroascorbato; AscH: ácido desidroascórbico; GSH: glutathiona; GSSG: glutathiona oxidada; R<sup>•</sup>: espécie radicalar; RH: molécula neutra.<sup>70, 87</sup>

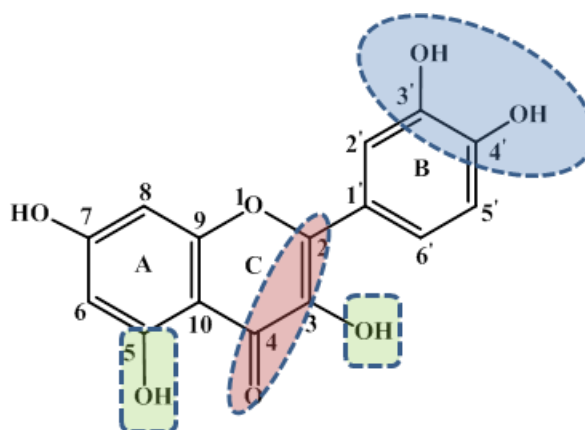
O α-tocoferol e carotenoides, como o β-caroteno, são agentes antioxidantes que atuam diretamente no processo de peroxidação lipídica, quebrando assim a cadeia destas reações radicalares.<sup>70</sup>

Os compostos fenólicos são descritos como cardioprotetores, reduzem o dano celular pós-isquemia, são agentes vasodilatadores, anticarcinogénicos, anti-inflamatórios,

antialérgicos, imuno-estimulantes, antimicrobianos ou com efeitos estrogénicos.<sup>18, 89, 90</sup> Estes efeitos benéficos atribuídos a estes compostos devem-se, na sua maioria, à sua capacidade antioxidante e ao seu efeito quelante. Os fenóis, principalmente os flavonoides, interferem na oxidação de lípidos e outras moléculas doando um ião hidrogénio (eletrão) aos radicais, quebrando desta forma a reação em cadeia. Devido à sua estrutura, o radical fenoxilo formado é relativamente estável, não iniciando nem propagando reações radicalares subsequentes, podendo até interagir com outros radicais, atuando desta forma como finalizador dessas mesmas reações.

Existem três características estruturais que se acredita serem determinantes para o potencial antioxidante dos flavonoides (**Figura 16**):<sup>91</sup>

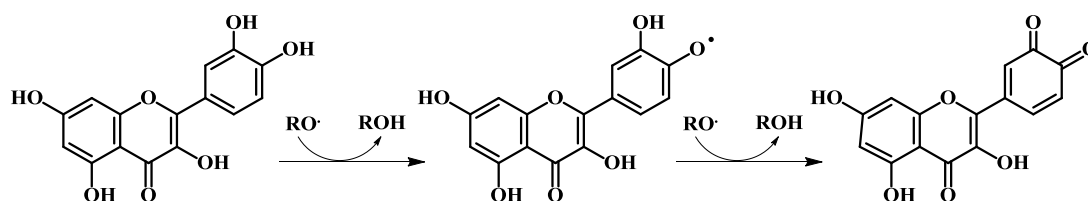
1. A existência de grupos hidroxilo em C3' e C4' do anel B (unidade catecol).
2. A dupla ligação C2=C3 em conjugação com o grupo cetónico no anel C.
3. A presença de um grupo hidroxilo em C3 no anel C e em C5 no anel A.



**Figura 16.** Características estruturais desejáveis que possibilitam a capacidade antioxidante dos flavonoides.<sup>92</sup>

A abstração de um átomo de hidrogénio por parte destes compostos está associada sobretudo à dupla hidroxilação do anel B nos carbonos 3' e 4' (grupo catecol), que após a sequestração do radical forma um radical *o*-semiquinona (**Figura 17**), que é estabilizado pela deslocalização eletrónica (ressonância). Este arranjo molecular é característico dos compostos fenólicos com maior capacidade de sequestração contra os radicais  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e a espécie não radicalar reactiva  $\text{ONOO}^-$ . Compostos fenólicos que não contêm um grupo

catecol ou pirogalhol (tri-hidroxilado) originam radicais instáveis e são sequestradores de radicais fracos.<sup>89</sup>

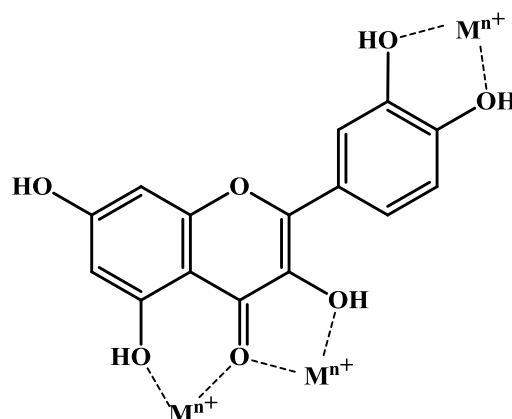


**Figura 17.** Exemplo de inativação de uma espécie radicalar por parte da quercetina.

RO•: espécie radicalar; RH: molécula neutra.<sup>92</sup>

A dupla ligação C2=C3 e o grupo cetônico no anel C são responsáveis pela conjugação entre os dois anéis aromáticos (estabilização por ressonância).<sup>93</sup> Crê-se que o grupo hidroxilo na posição 3 (3-OH) do anel heterocíclico C aumenta a estabilização do radical fenoxilo. Os flavonoides que contêm este grupo são planares, enquanto os que não o contêm são ligeiramente torcidos. A planaridade permite uma melhor conjugação entre os anéis aromáticos e um correspondente aumento da estabilização do radical fenoxilo. A ausência de 3-OH anula a coplanaridade e a conjugação, comprometendo a capacidade de sequestração.<sup>93</sup>

Adicionalmente, o grupo 3-OH do anel C em conjunto com o 5-OH do anel A e os grupos OH do anel B são importantes para a capacidade de quelatação de metais envolvidos na geração de espécies radicalares (**Figura 18**).<sup>94</sup>



**Figura 18.** Quelatação de metais por parte dos flavonoides. M<sup>n+</sup>: ião metálico.<sup>94</sup>

Os flavonoides metilados, *O*-glicosilados ou *C*-glicosilados têm uma atividade antioxidante menor, quando comparados com as suas respectivas aglíconas, uma vez que estas substituições, para além de diminuírem o número de grupos OH disponíveis para a abstração de H, provocam um impedimento estérico nos sítios de abstração, e afetam a coplanaridade da molécula, interferindo com a capacidade de deslocalização de eletrões, logo, formando radicais menos estáveis por ressonância.<sup>89</sup>

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus ésteres depende do número de grupos OH existentes na molécula. Os ácidos hidroxibenzóicos mono-hidroxilados são os que têm menor atividade antioxidante. A atividade dos ácidos hidroxibenzóicos di-hidroxilados é dependente da posição dos grupos OH no anel: ácidos di-hidroxilados na posição *orto* e *meta* relativamente ao grupo carboxilo apresentam maior atividade do que os seus correspondentes substituídos nas posições *meta* e *para*. Estes ácidos são menos ativos do que os seus correspondentes ácidos hidroxicinâmicos, que se diferenciam dos primeiros por conterem uma dupla ligação entre o anel aromático e o grupo carboxilo. Esta dupla ligação participa da estabilização do radical por ressonância, formando um radical mais estável. Tal como para os flavonoides, a metilação e glicosilação de ácidos fenólicos afeta a sua capacidade antioxidante.<sup>95</sup>

#### **1.4.4. Ensaio *in vitro* para avaliação da capacidade antioxidante**

Como já referido acima, as diferentes ROS/RNS estão implicadas em diversas patologias, sendo por isso importante encontrar um agente antioxidante com capacidade para sequestrar múltiplas ROS/RNS, podendo desta forma prevenir diversas doenças.

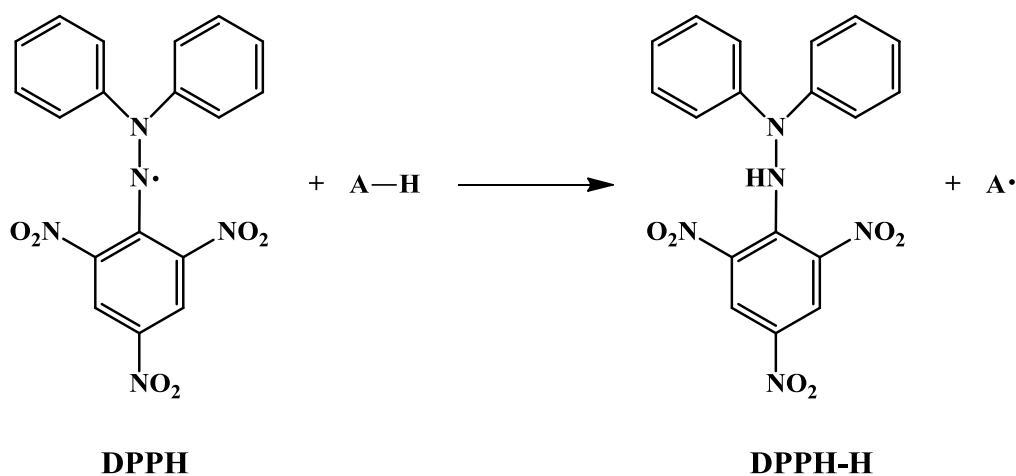
Atualmente existem vários métodos para determinar a capacidade antioxidante de determinado composto ou matriz complexa. Estes ensaios são relativamente simples, colorimétricos e não usam tecidos animais.<sup>96</sup> Estes métodos são classificados, de acordo com o mecanismo de ação do(s) antioxidante(s) a analisar, em três grupos: 1) aqueles que medem a capacidade de sequestração de um radical livre através da doação de um átomo de hidrogénio ou eletrão; 2) aqueles que avaliam a inibição de enzimas por parte do(s) agente(s) antioxidante(s), e 3) aqueles que medem a capacidade de quelatação de metais.



Os ensaios estudados neste trabalho pertencem ao primeiro grupo e são frequentemente utilizados como ensaios preliminares para seleção de agentes antioxidantes, e funcionam como o primeiro passo para avaliar a sua potencial utilização em diferentes patologias.<sup>96</sup>

#### 1.4.4.1. Atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>)

O ensaio do DPPH<sup>•</sup> é um dos ensaios mais usados para avaliar a atividade antioxidante de plantas. Este radical é muito estável, reage com compostos que doam átomos de hidrogénio ou eletrões e apresenta um máximo de absorção no UV-vis a 515 nm. Este é um método colorimétrico que se baseia na medição da capacidade de um antioxidante para reduzir o DPPH<sup>•</sup>. Este radical apresenta uma coloração roxa, quando é reduzido a 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH-H) a coloração tornar-se-á amarela (**Figura 19**). A atividade de sequestração é avaliada através da monitorização por espectrofotometria do decréscimo de absorvência a 515 nm. Quanto maior a descoloração do DPPH<sup>•</sup>, menor será a absorvência da mistura reacional, indicando desta forma maior atividade de sequestração de espécies reativas.<sup>79, 99</sup>

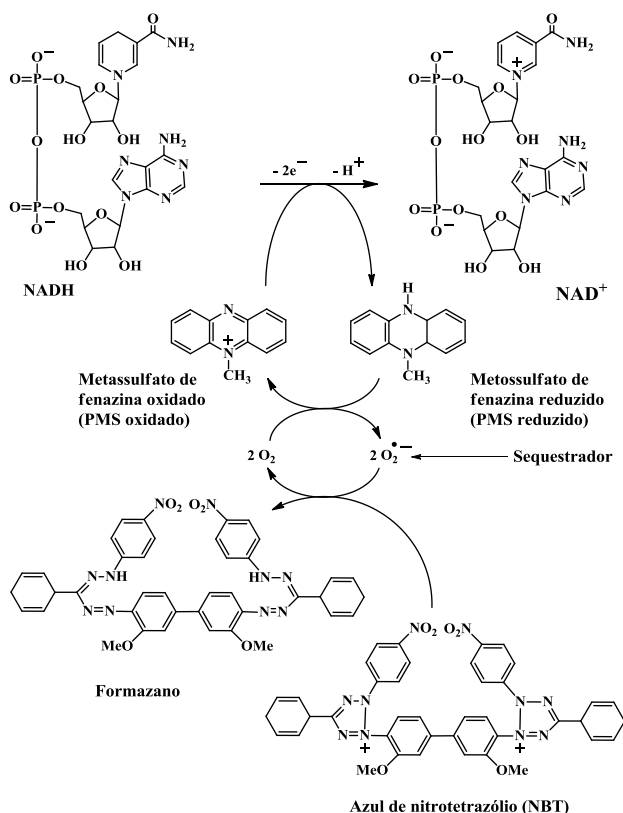


**Figura 19.** Mecanismo da reação entre o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) e um agente antioxidante (A-H), formando-se a 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH-H) e um radical do antioxidante (A<sup>•</sup>).<sup>98, 99</sup>

#### 1.4.4.2. Atividade sequestrante do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Os métodos *in vitro* para a determinação da capacidade de sequestração do  $O_2^{\cdot-}$  baseiam-se na redução por parte deste radical de uma molécula de azul de nitrotetrazólio (NBT) a formazano, a pH fisiológico. Esta reação monitoriza espectralmente a formação do formazano, que possui cor azul e cujo máximo de absorção surge a 560 nm.<sup>78</sup> Os agentes antioxidantes competem com o NBT pelo  $O_2^{\cdot-}$  diminuindo desta forma a velocidade de reação da formação do formazano.<sup>79, 100</sup>

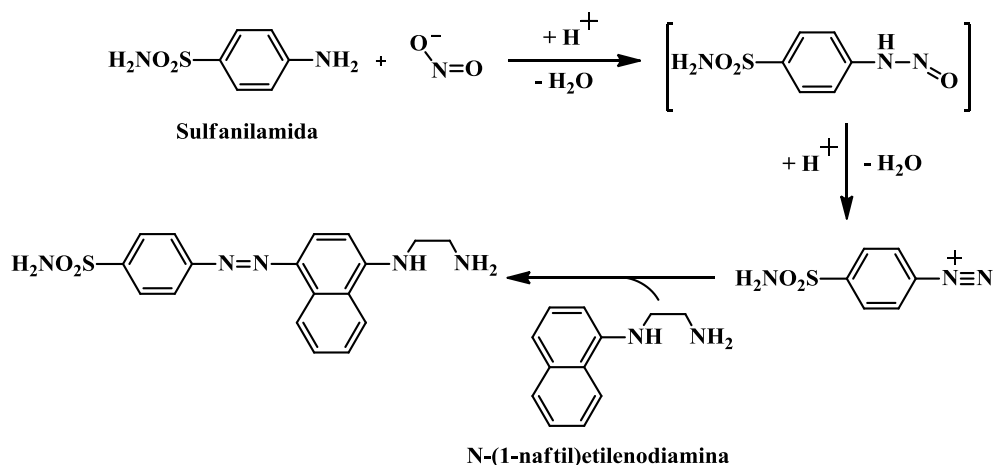
Neste ensaio o  $O_2^{\cdot-}$  usado para a avaliação da atividade antioxidante é primeiramente gerado por um sistema não-enzimático em que a molécula de metossulfato de fenazina (PMS) reduz o oxigénio molecular a  $O_2^{\cdot-}$ , na presença de NADH (**Figura 20**).<sup>79, 100</sup>



**Figura 20.** Reação da formação de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH, da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a formazano por parte do  $O_2^{\cdot-}$  e a ação de um sequestrador antioxidante no meio.<sup>101</sup>

### 1.4.4.3. Atividade sequestrante do radical óxido nítrico (•NO)

Um dos métodos mais comuns usados para avaliar a capacidade de sequestração do •NO é o chamado ensaio de diazotização ou reação de Griess. A pH fisiológico o •NO é gerado a partir do nitroprussiato de sódio (SNP). O primeiro reage depois com o oxigénio dando origem ao ião nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Este ião diazotiza com a sulfanilamida seguindo-se a ligação com a *N*-(1-naftil)etilenodiamina em condições ácidas (reagente de Griess), dando origem a um cromóforo rosa com um máximo de absorção a 546 nm (**Figura 21**). A quantidade de  $\text{NO}_2^-$  produzido pode ser medida pela monitorização da reação a este comprimento de onda. Desta forma, a partir deste processo é possível medir indiretamente a produção de •NO e a atividade sequestrante de determinado agente antioxidante, uma vez que qualquer molécula com capacidade para sequestrar este radical irá reduzir a produção do mesmo.<sup>96, 102</sup>



**Figura 21.** Reação de Griess.<sup>102</sup>

## 1.5. Inflamação e reparação de lesões

A cicatrização (reparação de lesões) ocorre em três fases distintas que se sobrepõem: (1) inflamação, (2) regeneração, e (3) remodelação, envolvendo uma sequência bem coordenada de respostas celulares.

A fase inflamatória é precedida pela formação de coágulos para parar a hemorragia e prevenir a invasão de agentes patogênicos. Este coágulo é composto por fibrina e constitui uma base provisória da matriz extracelular, proporcionando um suporte estrutural para a adesão celular e proliferação. A coagulação também desencadeia a produção de agentes pró-inflamatórios e ativação do sistema do complemento, leva a um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, à expressão de mediadores de inflamação como as quimiocinas, expressão de moléculas de adesão vascular e ao recrutamento de células do sistema imunológico. No local da ferida, os granulócitos e os macrófagos são cruciais no sistema imunitário inato, uma vez que atuam sobre agentes patogênicos invasores através da geração de espécies reativas, e induzem também a produção das moléculas pró-inflamatórias quimiocinas e citocinas.<sup>103</sup>

O padrão temporal e espacial em que a inflamação se desencadeia e finaliza é crucial para o processo de cicatrização adequado. Após a inflamação ocorre a fase de regeneração, na qual se dá a re-epitelização, neovascularização e cicatrização da ferida. Nesta fase, os fibroblastos produzem uma variedade de substâncias essenciais que formam um tecido conjuntivo amorfo, com características tipo gel, necessário para a migração, proliferação e resistência celular. Após a total re-epitelização, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos causando contração da ferida e reorganização das fibras do colagénio da matriz extracelular, levando finalmente à cicatrização e restauração da pele.<sup>104</sup>

Condições inflamatórias prolongadas, particularmente o ambiente oxidativo em que se encontra o local da lesão, podem interferir no processo normal da reparação da lesão. Em concentrações altas, as ROS/RNS provocam danos severos nos tecidos, levando a transformações neoplásticas que travam o processo de reparação.<sup>105</sup>

## 1.6. Objetivos

Este trabalho insere-se num projeto de investigação de cooperação entre o Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Química da Faculdade de Farmácia do Porto e o Instituto de Inovação Tecnológica dos Açores que visa a valorização da cultura de inhame no arquipélago dos Açores, tendo em vista a sua aplicação e/ou potencialidades para fins gastronómicos e terapêuticos.

Como referido ao longo da introdução, tradicionalmente o inhame é usado no tratamento de lesões dérmicas. O tratamento destas lesões poderá estar relacionado com as propriedades anti-inflamatórias de compostos fenólicos, que exercem esta atividade por mecanismos de sequestração de radicais livres envolvidos no processo inflamatório, que, como referido atrás, poderá ser prejudicial ao processo de reparação em situações prolongadas.

Tendo em conta estas considerações, os objetivos deste trabalho são:

- Caracterizar, quantificar e comparar a composição fenólica das diferentes variedades e condições de cultura de inhame dos Açores.
- Avaliar a relação das diferentes variedades de inhame dos Açores com a sua composição fenólica.
- Avaliar a relação das diferentes condições de cultura com a composição fenólica do inhame dos Açores.
- Avaliar a capacidade antioxidante das várias variedades de inhame dos Açores em relação ao radical DPPH<sup>•</sup>. Trata-se de um ensaio de rastreio para avaliar a capacidade antioxidante de um qualquer composto ou extrato.
- Avaliar a capacidade antioxidante das várias variedades de inhame dos Açores em relação ao radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que é considerado um “radical primário”, isto é, o primeiro radical a ser formado e precursor de espécies ainda mais reativas e nefastas.
- Avaliar a capacidade antioxidante das várias variedades de inhame dos Açores em relação ao radical óxido nítrico (<sup>•</sup>NO), que está associado à sinalização do sistema imunitário.

- Relacionar a capacidade antioxidante das diferentes variedades de inhame dos Açores com a sua composição fenólica.



## **Materiais e Métodos**





## 2. Materiais e Métodos

### 3.1. Substâncias de referência e reagentes

Os ácidos cafeico, 5-*O*-cafeoilquínico e *p*-cumárico, e os heterósidos luteolina-3',7'-di-*O*-glucósido, apigenina-8-*C*-glucósido, apigenina-6-*C*-glucósido, luteolina-8-*C*-glucósido, luteolina-6-*C*-glucósido, apigenina-6-*C*-glucósido-7-*O*-glucósido, e o crisoeriol foram adquiridos à empresa Extrasynthèse (Genay, França).

O DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), dinucleótido de β-nicotinamida e adenina (NADH), metossulfato de fenazina (PMS), nitroprussiato de sódio desidratado (SNP), azul de nitrotetrazólio (NBT) e sulfanilamida foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O di-cloreto de *N*-(1-naftil)etilenodiamónio, metanol, di-hidrogenofosfato de potássio, peróxido de hidrogénio, ácidos acético e *orto*-fosfórico foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). O hidróxido de sódio foi adquirido à Panreac (Barcelona, Espanha).

A água usada nas fases móveis foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). O metanol e o ácido acético com qualidade Lichrosolv foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol e o ácido clorídrico, de qualidade pró-análise, foram adquiridos à Merck e à Panreac, respetivamente. Para os diferentes procedimentos de extração foi utilizada água destilada.

## 2.2. Amostras

As folhas das diversas variedades de *C. esculenta*, no mesmo estado de desenvolvimento, sujeitas a condições de cultura diferentes, foram colhidas nas Furnas, ilha de S. Miguel, Açores, em Junho de 2011 (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Amostras de *C. esculenta* analisadas neste trabalho.

Amostra	Variedade	Condições de cultura (rega)
Branco gigante	“Branco gigante”	Água fria permanentemente
Vermelho	“Vermelho”	Água fria permanentemente
ABS	“Branco”	Sem rega (sequeiro)
FAQ1	“Branco”	Água quente
FAFB	“Branco	Água fria permanentemente

As amostras vegetais foram transferidas para o laboratório onde foram secas durante 2 semanas a 30°C. Depois de seco, o material foi reduzido a pó (tamanho médio das partículas inferior a 910 µm) e armazenado num exsicador até à sua utilização.

As amostras analisadas correspondem à mistura de folhas de três plantas diferentes da mesma variedade.

## 2.3. Extração de compostos fenólicos

Para a determinação qualitativa dos compostos fenólicos foram adicionados 2 mL de água a 0.2 g de cada uma das amostras seca “branco gigante” e “vermelho”. A mistura foi de seguida sonicada, centrifugada (12000 rpm, 5 min), e filtrada (tamanho do poro da membrana: 0.20 µm)

Para a determinação quantitativa dos compostos fenólicos bem como a avaliação do potencial antioxidante das amostras, o procedimento de extração usado foi o seguinte:

- 0.2 g de amostra de *C. esculenta* seca foram extraídos com 50 mL de água;

- A mistura foi ultrasonificada durante 30 min e posteriormente centrifugada a 1200 rpm durante 1h;
- O sobrenadante foi recolhido e filtrado por um funil de Büchner, com auxílio de pressão reduzida;
- O filtrado foi evaporado à secura, a 40°C, em evaporador rotativo Buchi (Suíça), constituído por controlador de vácuo V-850, rotavapor R-215, bomba de vácuo 700 e banho de água B-491.

## **2.4. Análise qualitativa de compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>**

As análises qualitativas foram realizadas num cromatógrafo Agilent 1100 Series equipado com um DAD e detetor MS em série (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A coluna usada para proceder à separação dos compostos foi uma Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido). A fase móvel usada para proceder à eluição consistiu em dois solventes: água-ácido acético (1%) (A) e metanol (B). O gradiente usado consistiu em: 20% de B aos 0 min, 35% de B aos 20 min, 50% de B aos 30 min e finalmente 90% de B aos 32 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 40 µL. Os dados espectrais de todos os picos foram acumulados no intervalo de 240-400 nm e os cromatogramas foram registados a 340 nm. O sistema de HPLC foi controlado pelo software ChemStation (Agilent, v 08.03). O detetor de massa usado era constituído por um analisador “Ion Trap” equipado com uma interface e fonte de ionização ESI, sendo controlado pelo software LCMSD (Agilent, v. 4.1). As condições de ionização foram ajustadas para 350 °C e 4 kV para a temperatura do capilar e voltagem, respetivamente. A pressão do nebulizador e taxa de fluxo de azoto foi de 65 psi e 11 L/min, respetivamente. O varrimento de massa total cobriu a gama de 100 *m/z* a 1500 *m/z*. A fragmentação por colisão induzida realizou-se utilizando hélio como gás de colisão, com ciclos de voltagem de 0.3 até 2 V. Os dados de MS foram adquiridos no modo de ionização negativa. A espectrometria de massa Tandem MS<sup>2</sup> foi realizada no modo automático a partir dos iões fragmento mais abundantes da MS e a espectrometria de massa MS<sup>3</sup> foi realizada no modo manual.

## 2.5. Análise quantitativa de compostos fenólicos por HPLC-DAD

### 2.5.1. Método de HPLC e padrões externos usados

Para a análise quantitativa, o extrato aquoso redissolvido (50 mg / mL em água) foi analisado num HPLC-DAD (Gilson) utilizando uma coluna Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm; Phenomenex). A fase móvel consistiu em dois solventes: água-ácido acético (1%) (A) e metanol (B). O gradiente usado consistiu em: 20% B aos 0 min, 35% de B aos 30 min, 50% de B aos 40 min, 90% de B aos 42 min, e finalmente 100% de B aos 50 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi 20 µL. Os dados espectrais de todos os picos foram recolhidos na gama de 200-400 nm e os cromatogramas foram registados a 320 nm para os ácidos hidroxycinâmicos e a 340 nm para os flavonoides. Os dados foram processados no software do sistema Unipoint.

A quantificação dos compostos fenólicos obteve-se a partir da absorvência registada nos cromatogramas relativos aos padrões de calibração externa. Uma vez que não existem padrões comercialmente disponíveis para todas as classes de compostos identificados, os derivados di-*C*-glicósidos, mono-*C*-(*O*-glicosil)glicósidos e di-*C*-(*O*-glicosil)glicósidos de luteolina, apigenina, e crisoeriol foram quantificados como luteolina-3',7-di-*O*-glucósido, apigenina-6-*C*-glicósido-7-*O*-glucósido e crisoeriol, respetivamente. A luteolina-7-*O*-ramnosil(1 → 2)hexósido foi também quantificada como luteolina-3',7-di-*O*-glucósido e o crisoeriol-7-*O*-ramnosil(1 → 6)hexósido como crisoeriol. Pela mesma razão, os derivados de ácido cafeico foram quantificados como ácido cafeico e derivados de ácidos cafeoilquínicos como ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Em casos de coeluição, foi possível identificar o composto mais abundante a partir dos espectros de UV, sendo então quantificados como o padrão análogo do composto maioritário. Assim, a apigenina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido, os isómeros de apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido e a luteolina-6-*C*-(3-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido (compostos **16** a **19**) foram quantificados em conjunto como apigenina-6-*C*-glucósido-7-*O*-glucósido. Da mesma forma, o par diosmetina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido e apigenina-6-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido (**29** + **30**), assim como o par luteolina-6-*C*-hexósido e luteolina-6-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**26** + **27**) foram quantificados como luteolina-6-*C*-glicósido. O composto **41** (derivado de um ácido di-hidrocafeoilquínico) e o composto **9** (luteolina 6,8-

di-*C*-hexósido) foram quantificados em conjunto, como ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Os restantes compostos foram quantificados pelos seus respetivos padrões de referência.

### 2.5.2. Validação do método de quantificação

Para os ensaios de validação do método de quantificação utilizou-se a variedade “branco gigante” uma vez que era a amostra disponível em quantidade mais elevada. Os padrões de referência usados para a validação foram: três ácidos fenólicos (cafeico, 5-*O*-cafeoilquínico e *p*-cumárico), seis flavonoides glicosilados (apigenina-8-*C*-glucósido, apigenina-6-*C*-glucósido, luteolina-8-*C*-glucósido, luteolina-6-*C*-glucósido, apigenina-6-*C*-glucósido-7-*O*-glucósido, e luteolina-3',7-*O*-di-glucósido) e um flavonoide livre (crisoeriol).

As curvas de calibração foram obtidas pelo método do padrão externo, através da injeção em triplicado de cinco níveis de concentração de soluções-padrão (8,5-68 µg/mL para a luteolina-8-*C*-glucósido, 27,1-217 µg/mL para a luteolina-6-*C*-glucósido, 2,34-18,75 µg/mL para a apigenina-8-*C*-glucósido, 4,13-33 µg/mL para a apigenina-6-*C*-glucósido, 6,38-102 µg/mL para a apigenina-6-*C*-glucósido-7-*O*-glucósido, 6,86-110 µg/mL para a luteolina-3',7-*O*-di-glucósido, 1,03-66 µg/mL para o crisoeriol, 4,13-132 µg/mL para o ácido cafeico, 5,63-90 µg/mL para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e 7,5-60 µg/mL para o ácido *p*-cumárico). As áreas dos picos cromatográficos foram registadas a 320 nm para os ácidos hidroxicinâmicos e a 340 nm para os flavonoides e representadas em função das concentrações conhecidas das soluções-padrão.

Os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir do desvio padrão residual da reta de regressão linear ( $\sigma$ ) e do declive (*S*), segundo as seguintes equações:  $LOD = 3,3\sigma/S$ ;  $LOQ = 10\sigma/S$ .

A repetibilidade (ensaios intra-dia) foi calculada a partir da análise em triplicado de três concentrações diferentes de soluções de referência no mesmo dia e expressa como desvio padrão relativo (RSD).

A precisão intermédia (ensaios inter-dias) foi calculada através da análise da concentração média três vezes por dia, durante três dias e expressa como RSD.

Para a realização dos ensaios de recuperação (exatidão do método) adicionaram-se à amostra soluções-padrão de compostos encontrados na mesma, em concentrações baixa,

média e alta destes: ácido cafeico (3,00, 8,00 e 13,00 µg/mL), ácido *p*-cumárico (3,00, 8,00, e 13,00 µg/mL), apigenina-8-*C*-glucósido (2,00, 7,00, e 12,00 µg/mL), apigenina-6-*C*-glucósido (4,00, 9,00, e 14,00 µg/mL), luteolina-8-*C*-glucósido (2,00, 4,00, e 6,00 µg/mL) e luteolina-6-*C*-glucósido (50,00, 100,00, 150,00 e µg/mL).

## 2.6. Avaliação do potencial antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos aquosos da amostra foi determinada em microensaios baseados no sequestro do radical DPPH, superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) através de espectrofotometria de UV/Vis.

### 2.6.1. Ensaio do radical DPPH

A avaliação da atividade sequestrante para o radical DPPH foi determinada num microensaio, por espectrofotometria do UV/Vis, monitorizando a redução do  $DPPH^{\bullet}$  a um comprimento de onda de 515 nm, segundo o procedimento descrito por Vinholes *et al.* (2011).<sup>106</sup> As determinações de absorvência foram realizadas num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation).

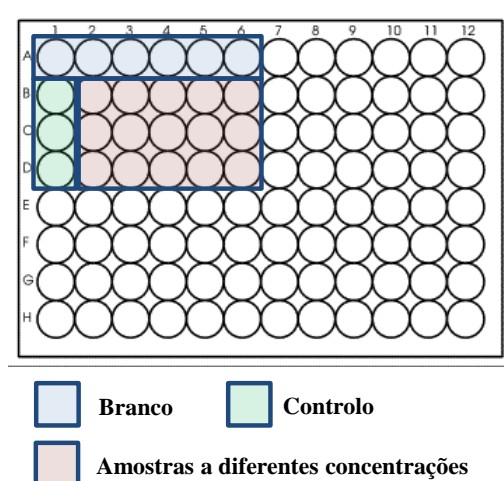
Para a realização do ensaio o resíduo do extrato aquoso da amostra foi redissolvido em metanol. De forma a determinar a concentração do resíduo seco ( $m_{\text{resíduo seco}}/ml$ ), o matraz usado na evaporação do extrato foi previamente tarado. Para cada extrato foi preparada, numa placa de 96 poços, uma série de diluições (5 concentrações diferentes), tendo-se efetuado três ensaios, em triplicado.

A mistura reacional em cada poço com amostra consistia em 25 µL de resíduo seco redissolvido em metanol e 200 µL de solução metanólica de  $DPPH^{\bullet}$  a 150 µM.

Após a adição da solução do radical a placa foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e durante 30 min – período de tempo necessário para que a reação seja completa (ausência da variação da absorvência).

Simultaneamente realizou-se um ensaio "em branco" para cada concentração de amostra, substituindo o  $DPPH^{\bullet}$  por metanol. Adicionalmente, em todos os ensaios foi efetuado também o controlo que correspondia à adição de metanol em substituição do extrato metanólico da amostra (**Figura 22**).

Adicionalmente, realizou-se um ensaio com o ácido ascórbico, nas mesmas condições em que foi realizado o ensaio com a amostra.



**Figura 22.** Ensaio de sequestro do DPPH<sup>•</sup>.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição do sequestro do radical DPPH relativamente ao controlo, usando a equação seguinte:

$$\% \text{ Sequestro de DPPH}^{\bullet} = 100 \times (1 - (A_a - A_b) / (A_c - A_b))$$

$A_a$  = absorvência da amostra

$A_c$  = absorvência do controlo

$A_b$  = absorvência do branco

O valor da concentração mínima para inibir 50% da reação ( $IC_{50}$ ) para as diferentes amostras foi determinado por interpolação no gráfico de % de sequestro de DPPH<sup>•</sup> em função da concentração de amostra e comparado com o valor obtido para o ácido ascórbico.



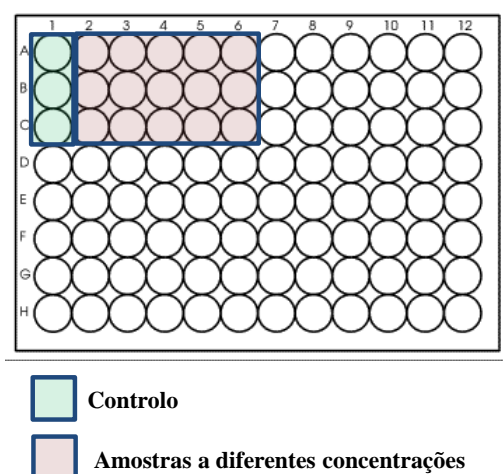
### 2.6.2. Ensaio do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Para a determinação do potencial antioxidante relativamente ao radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) é monitorizada a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a formazano, composto azul, com máximo de absorção no UV/vis a 560 nm. Qualquer molécula capaz de sequestrar o  $O_2^{\bullet -}$  irá provocar uma diminuição da velocidade de redução do NBT.<sup>106</sup>

Para a realização do ensaio o extrato seco de cada amostra foi redissolvido em tampão [hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 19 mM, pH 7,4]. De forma a determinar a concentração do resíduo seco ( $m_{\text{resíduo seco}}/\text{ml}$ ), o matraz usado na evaporação do extrato foi previamente tarado. Para cada extrato foi preparada uma série de diluições (5 concentrações diferentes) numa placa de 96 poços. Foram realizados três ensaios, em triplicado e à temperatura ambiente.

A mistura reacional em cada poço com amostra consistia em 50  $\mu\text{L}$  de resíduo seco redissolvido em tampão, 50  $\mu\text{L}$  de NADH 166  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{L}$  de NBT 43  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{L}$  de PMS 2,7  $\mu\text{M}$ , em solução tampão. Em todos os ensaios foi efetuado um controle que correspondia à adição de tampão em substituição da amostra (**Figura 23**).

Adicionalmente, realizou-se um ensaio com o ácido ascórbico, nas mesmas condições em que foi realizado o ensaio com a amostra.



**Figura 23.** Ensaio de sequestração do  $O_2^{\bullet -}$ .

A monitorização espectrofotométrica da reação de redução do NBT foi realizada num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo, Electron Corporation), durante 2 minutos, no comprimento de onda de 562 nm.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da redução do NBT relativamente ao controlo, usando a equação seguinte:

$$\% \text{ Inibição da redução do NBT} = 100 \times (1 - A_a / A_c)$$

$A_a$  = absorvência da amostra

$A_c$  = absorvência do controlo

A determinação do IC<sub>50</sub> foi realizada por interpolação no gráfico de % sequestro de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> *versus* concentração de extrato e comparado com o valor obtido para o ácido ascórbico.

### 2.6.3. Ensaio do radical óxido nítrico (•NO)

A determinação da capacidade de sequestro do radical óxido nítrico (•NO) baseia-se na monitorização da diminuição de formação do cromóforo de cor rosa, resultante da reação de Griess, a um comprimento de onda de 562 nm, como é descrito por Vinholes *et al.* (2011).<sup>106</sup> O •NO é gerado espontaneamente pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em solução aquosa a pH fisiológico.

As absorvências foram determinadas utilizando um leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo, Electron Corporation).

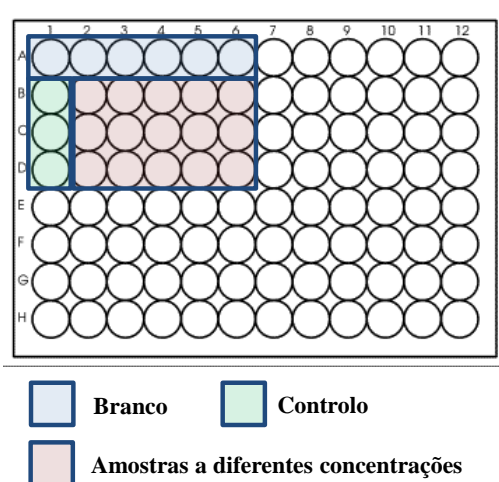
Para a realização do ensaio o extrato seco foi redissolvido em tampão (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, pH 7,4). De forma a determinar a concentração do resíduo seco ( $m_{\text{resíduo seco}}/\text{ml}$ ), o matraz usado na evaporação do extrato foi previamente tarado. Para cada extrato foi preparada uma série de diluições (5 concentrações diferentes) numa placa de 96 poços. Foram realizados três ensaios, em triplicado e à temperatura ambiente.

A cada poço foram adicionados 100 µL da solução tamponada de SNP 20 mM e 100 µL de amostra dissolvida em tampão. As placas foram expostas à luz, durante 60 min, à temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado a cada poço 100 µL de reagente

de Griess (1 g sulfanilamida, 100 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 2% e 0,1 g di-cloreto de *N*-(1-naftil)etilenodiamônio), seguiu-se uma incubação durante 10 min na ausência de luz, à temperatura ambiente e finalmente a determinação da absorção no UV-Vis.

Simultaneamente realizou-se um ensaio "em branco" para cada concentração de amostra, usando a mesma ordem de adição de reagentes e substituindo apenas o reagente de Griess por ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 2%. Em todos os ensaios foi efetuado um ensaio controle que correspondia à adição de tampão em substituição da amostra (**Figura 24**).

Adicionalmente, realizou-se um ensaio com o ácido ascórbico, nas mesmas condições em que foi realizado o ensaio com a amostra.



**Figura 24.** Ensaio de sequestração do <sup>•</sup>NO.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da produção de nitrito relativamente ao controlo:

$$\% \text{ Inibição da produção de nitrito} = 100 \times (1 - (A_a - A_b)/(A_c - A_b))$$

$A_a$  = absorvência da amostra

$A_c$  = absorvência do controlo

$A_b$  = absorvência do branco

Os valores de IC<sub>50</sub> para as diferentes amostras foram obtidos por interpolação no gráfico de % sequestro de <sup>•</sup>NO *versus* concentração de extrato e comparado com o valor obtido para o ácido ascórbico.

## **2.7. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados usando o programa GraphPad Prism (versão 5.02). A análise de variância bidimensional (2wayANOVA) foi realizada a partir dos dados obtidos de três ensaios independentes de cada amostra realizados em triplicado. O nível de significância foi obtido usando um valor de *p* menor que 0,05.



## **Resultados e Discussão**



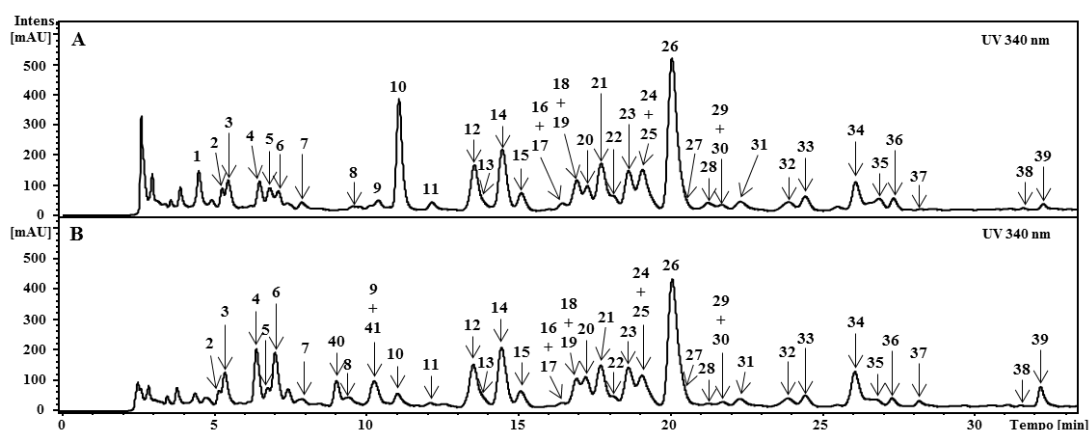
### 3. Resultados e discussão

Com o objetivo de identificar, quantificar e comparar a composição fenólica das diferentes variedades de *C. esculenta*, procedeu-se primeiramente à identificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> das variedades “branco gigante” e “vermelho”, seguindo-se a quantificação destas e das amostras de inhame branco sujeitos a diferentes tipos de cultura. A análise de uma variedade sujeita a diferentes tipos de cultura teve como objetivo avaliar o efeito de tal na biossíntese de compostos fenólicos, assim como a relação da presença ou ausência de um determinado composto ou grupo de compostos fenólicos com a atividade antioxidante apresentada.

#### 3.1. Caracterização de compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>

A análise por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> do extrato aquoso das folhas de duas variedades de *C. esculenta* ("branco gigante " e "vermelho") permitiu-nos detetar a presença de um elevado número de derivados de ácidos hidroxicinâmicos (**1-7**, **10**, **20**, **40** e **41**) e glicósidos de flavonoides (**8**, **9**, **11-19** e **21-39**) (**Tabela 4**). O perfil cromatográfico das duas variedades é semelhante, diferindo apenas na abundância relativa e na presença ou ausência de alguns dos compostos (**Figuras 25A e 25B**). As antocianinas descritas em trabalhos anteriores<sup>20, 107</sup> não foram detetadas nas amostras analisadas.





**Figura 25.** Perfil cromatográfico a 340 nm dos compostos fenólicos identificados no extrato aquoso das folhas de *C. esculenta*. Variedades (A) “branco gigante” e (B) “vermelho”. (1-6) Derivados do ácido cafeico; (7) sinapoil-hexósido; (8) apigenina-6-*C*-hexósido-7-*O*-hexósido; (9) luteolina-6,8-di-*C*-hexósido; (10) ácido cafeico; (11) luteolina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido; (12) luteolina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (13) apigenina-6,8-di-*C*-hexósido; (14) luteolina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (15) luteolina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido; (16) apigenina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido; (17) apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido; (18) apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido; (19) luteolina-6-*C*-(3-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido; (20) ácido *p*-cumárico; (21) apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido; (22) luteolina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido; (23) luteolina-8-*C*-hexósido; (24) apigenina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (25) crisoeriol-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (26) luteolina-6-*C*-hexósido; (27) luteolina-6-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido; (28) apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido; (29) diosmetina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (30) apigenina-6-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido; (31) apigenina-8-*C*-hexósido; (32) apigenina-8-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido; (33) apigenina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido; (34) apigeina-6-*C*-hexósido; (35) crisoeriol-8-*C*-hexósido; (36) crisoeriol-6-*C*-hexósido; (37) luteolina-7-*O*-ramnosil(1→2)hexósido; (38) crisoeriol-7-*O*-hexósido; (39) crisoeriol-7-*O*-ramnosil (1→6)hexósido; (40, 41) derivados do ácido dihidrocafeoilquínico.

### Derivados de ácidos hidroxicinâmicos

Neste estudo foram detetados uma série de isómeros com espectros de UV característicos de derivados do ácido cafeico (UV: 298inf, 326 nm) e com ião molecular

desprotonado ( $[M-H]^-$ ) a  $m/z$  371 (compostos **1-6**, Tr.: 4,4, 5,2, 5,4, 6,4, 6,7, 7,1 min). As suas fragmentações  $MS^2$  mostraram iões a  $m/z$  353 (10%, -18), 209 (100%, -162), 191 (20%, -162-18), indicando que estes compostos podem ser isómeros do ácido cafeoilglucárico. O composto **1** não foi detetado na variedade "vermelho".

O composto **7** foi caracterizado como ácido glucosilsinápico (Tr.: 7,8 min; UV: 292 inf, 330 nm; MS: 385  $[M-H]^-$ ,  $MS^2(385)$ : 223 (100%, -162)).

Os compostos **10** e **20** foram caracterizados como ácido cafeico e ácido *p*-cumárico, respetivamente (**10**, Tr.: 11,0 min; UV: 298 inf, 325 nm; MS: 179  $[M-H]^-$ ,  $MS^2(179)$ : 134 (100%, -45); **20**, Tr.: 17,2 min; UV: 296 inf, 310 nm; MS: 119  $[(M-H)-44]^-$ ).

Os compostos **40** e **41**, que foram encontrados apenas na variedade "vermelho" (**Figura 25**), são isómeros de ácido di-hidrocafeoilquínico, apresentando os mesmos espectros UV e de massa (**40**, Tr: 9,1 min; **41**, Tr: 10,3 min; UV: 298 inf, 318 nm; MS: 355  $[M-H]^-$ ,  $MS^2(355)$ : 191 (100%, -164)).

## Flavonoides

As duas variedades estudadas inicialmente apresentaram o mesmo perfil cromatográfico no que diz respeito a flavonoides, diferindo apenas na sua abundância. Foram detetadas dezanove flavonas *C*-glicosiladas (compostos **9**, **12-15**, **17**, **18**, **21-26**, **29**, **31**, **33-36**), oito flavonas *O*-glicosil-*C*-glicosiladas (compostos **8**, **11**, **16**, **19**, **27**, **28**, **30**, **32**) e três flavonas *O*-glicosiladas (compostos **37-39**) (**Figura 25**), todos eles apresentando espectro de UV característico de flavonoides (**Tabela 4**).<sup>44</sup>

## Flavonas mono-*C*-glicosiladas

O espectro de massa dos compostos **23**, **26**, **31** e **34-36** mostrou fragmentações características de flavonas mono-*C*-hexósido com perdas de 90 e 120 amu, correspondendo aos iões  $[Aglícona(Aglc)+71]^-$  e  $(Aglc+41)^-$ , que caracterizam as aglíconas mono-*C*-glicosiladas<sup>108</sup>: **23/26** luteolina ( $Aglc+71/41$ ,  $m/z$  357, 327), **31/34** apigenina ( $m/z$  341, 311), **35/36** tri-hidroxi-metoxiflavona ( $m/z$  371, 341), provavelmente o crisoeriol (**Tabela 4**).

A ordem de eluição, bem como a observação de perda de água (18 amu) dos compostos **26**, **34** e **36**, indicam que a *C*-glicosilação se encontra no carbono 6 (C-6), enquanto para os compostos **23**, **31** e **35** essa mesma ligação está em C-8.<sup>108</sup>

A detecção de orientina (luteolina-8-*C*-glucósido), isoorientina (luteolina-6-*C*-glucósido), vitexina (apigenina-8-*C*-glucósido) e isovitexina (apigenina-6-*C*-glucósido) numa outra variedade de *C. esculenta*, reportada por Iwashina *et al.* (1999)<sup>21</sup> e Leong *et al.* (2010),<sup>11</sup> confirma a identidade do composto **23** como orientina, **26** como isoorientina, **31** como vitexina, **34** como isovitexina e, provavelmente, **35** como escoparina (crisoeriol-8-*C*-glucósido) e **36** como isoscoparina (crisoeriol-6-*C*-glucósido).

### Flavonas di-*C*-glicosiladas

Os compostos **9** e **13** são derivados de 6,8-di-*C*-hexósidos de luteolina e apigenina, respetivamente, como demonstrado pela presença dos iões [Aglc+113]<sup>-</sup> e [Aglc+83]<sup>-</sup> (**Tabela 4**), que caracterizam as aglíconas de flavonas di-*C*-glicósido<sup>108</sup>. No seu trabalho, Iwashina *et al.*<sup>19</sup> também detetaram a apigenina-6,8-di-*C*-glucósido; por conseguinte, os compostos **9** e **13** poderão corresponder a luteolina-6,8-di-*C*-glucósido (lucenina-2) e apigenina-6,8-di-*C*-glucósido (vicenina-2), respetivamente.

Os compostos **12**, **14**, **15** e **22** são isómeros, apresentando um ião molecular desprotonado com *m/z* 579 e iões que caracterizam a sua aglícona como luteolina {[Aglc+113/83]<sup>-</sup>, *m/z* 399/369}, sendo portanto isómeros de luteolina-*C*-hexósido-*C*-pentósido. A fragmentação MS<sup>2</sup> destes compostos exibiu os iões [(M-H)-18]<sup>-</sup>, [(M-H)-60]<sup>-</sup>, [(M-H)-90]<sup>-</sup> e [(M-H)-120]<sup>-</sup>, sendo este último muito abundante (pico base) em **12** e **14** e de baixa abundância em **15** e **22** (**Tabela 4**). Assim, tendo em conta que o açúcar em C-6 é o que sofre uma fragmentação preferencial,<sup>108</sup> os compostos **12** e **14** podem ser caracterizados como luteolina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido, e **15** e **22** como luteolina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido.

**Tabela 4.** Tempo de retenção (Tr) e espectros de UV, MS: [M-H]<sup>+</sup> e MS<sup>2</sup>: [M-H]<sup>+</sup> de flavonoides das folhas de *C. esculenta*<sup>a</sup>.

Compostos <sup>b</sup>	Tr (min)	UV (nm)	[M-H] <sup>+</sup> , m/z		MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>+</sup> , m/z(%)	
			Flavonas mono-C-glicósido		-18	
23	18,6	256;268inf;350	447		-60	Aglyc+41 327(100)
26	20,1	256;268inf;350	447	429(10)	387(11)	357(25) 327(96)
31	22,3	269;338	431			341(17) 311(100)
34	26,1	270;336	431	413(13)		341(40) 311(100)
35	26,8	---- <sup>c</sup>	461			371(2) 341(100)
36	27,3	256inf;270;346	461	443(4)		371(40) 341(100)
<b>Flavonas di-C-glicósido</b>						
9	10,4	258inf;272;346	609	-18	-120	Aglyc+113 399(25)
12	13,5	258inf;270;348	579	591(2)	489(100)	369(12) 369(19)
13	13,8	---- <sup>c</sup>	593	561(20)	459(100)	399(40) 383(50)
14	14,4	258inf;270;348	579	575(1)	473(100)	383(50) 369(27)
15	15,1	258inf;270;348	579	561(7)	459(100)	399(32) 369(48)
17	16,4	---- <sup>c</sup>	563	519(6)	459(3)	399(72) 353(100)
18	16,9	258inf;270;346	563	545(20)	443(50)	383(78) 353(100)
21	17,7	258inf;270;346	563	503(65)	443(38)	383(89) 353(39)
22	18,2	---- <sup>c</sup>	579	545(10)	443(32)	399(35) 369(25)
24	19,0	258inf;270;346	563	503(62)	459(12)	383(86) 353(100)
25	19,1	---- <sup>c</sup>	593	519(18)	473(100)	413(59) 383(74)
29	21,5	---- <sup>c</sup>	593	545(7)	473(90)	413(30) 383(100)
33	24,4	258inf;270;346	563	575(9)	443(100)	383(29) 353(77)
<b>Flavonas mono-C-(O-glicosil)glicósido</b>						
11	12,1	256;270;348	609	-90	-180	Aglyc+71 357(100)
16	16,4	---- <sup>c</sup>	593	-120		341(19) 311(100)
27	20,4	---- <sup>c</sup>	579	459(72)		357(52) 327(68) <sup>d</sup>
32	23,8	270;336	563	443(14)		341(7) 311(1) <sup>d</sup>
<b>Flavonas di-C-glicósido-O-glicósido</b>						
8	9,5	---- <sup>c</sup>	725	-18	-120	-162 563(100)
19	16,9	---- <sup>c</sup>	741	707(4)	605(33)	579(38) 561(100)
28	21,2	---- <sup>c</sup>	725	723(9)	605(5)	563(100) 545(11)
30	21,7	---- <sup>c</sup>	725	665(1)	605(9)	563(100) 545(20)
<b>Flavonas O-glicósido</b>						
37	28,2	257;266inf;348	593	707(4)	-146	Aglyc-H 285(100)
38	31,6	---- <sup>c</sup>	461		447(60)	299(100) 299
39	32,2	255;266;348	607			

**Tabela 4 - Legenda:** <sup>a</sup> Principais fragmentos observados.

<sup>b</sup> Lut: luteolina; Api: apigenina; Cris: crisoeriol; Diosmt: diosmetina; Hex: hexósido; Pent: pentósido; Ramn: ramnósido. Aglc-aglícóna.

<sup>c</sup> Coeluem com outros compostos ou estão em quantidades vestigiais e o seu espectro não pode ser adequadamente observado.

<sup>d</sup> Outros iões observados (Aglc+41-18): (27)  $m/z$  309 (10%) e (32)  $m/z$  293 (45%).

<sup>e</sup> (8)  $-MS^3(725 \rightarrow 563)$ : 545(23, -18), 503(65, -60), 473(62, -90), 443(53, -120), 383(100, Aglc+113), 353(62, Aglc+83).

<sup>f</sup> (19)  $-MS^3(741 \rightarrow 579)$ : 561(4, -18), 489(22, -90), 459(100, -120), 399(45, Aglc+113), 369(21, Aglc+83).

<sup>g</sup> (28)  $-MS^3(725 \rightarrow 563)$ : 545(19, -18), 503(54, -60), 473(59, -90), 443(50, -120), 383(86, Aglc+113), 353(100, Aglc+83).

<sup>h</sup> (30)  $-MS^3(725 \rightarrow 563)$ : 545(9, -18), 503(26, -60), 473(42, -90), 443(22, -120), 441(100, -120-2H), 383(40, Aglc+113), 353(40, Aglc+83).

Os compostos **17**, **18**, **21**, **24** e **33** são derivados de apigenina-*C*-hexósido-*C*-pentósido {[Aglc+113/83]<sup>-</sup>,  $m/z$  383/353}. A elevada abundância dos iões [(M-H)-60]<sup>-</sup>, e/ou [(M-H)-90]<sup>-</sup> em **17**, **18** e **21** indica a substituição com uma pentose na posição 6, enquanto em **24** e **33** o ião [(M-H)-120]<sup>-</sup> é muito abundante e característico de uma hexose na posição 6 (**Tabela 4**). Assim, os compostos **17**, **18** e **21** podem ser caracterizados como apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósidos, e os compostos **24** e **33** como apigenina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósidos. Num trabalho anterior, Leong *et al.* (2010)<sup>11</sup> descreve a ocorrência de chaftósido (apigenina-6-*C*-glucósido-8-*C*-arabinósido) e isochaftósido (apigenina-6-*C*-arabinósido-8-*C*-glucósido) em *C. esculenta*.

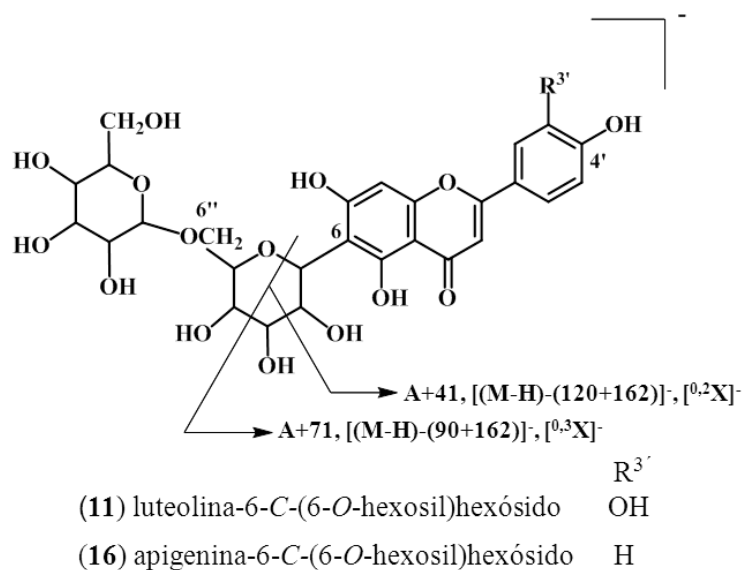
O compostos **25** e **29** são tri-hidroxi-metoxiflavonas-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido {[M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  593; [Aglc+113/83]<sup>-</sup>,  $m/z$  413/383 e um ião [(M-H)-120]<sup>-</sup> abundante (**Tabela 4**)}, provavelmente derivados de crisoeriol (5,7,4'-tri-hidroxi-3'-metoxiflavona) e diosmetina (5,7,3'-tri-hidroxi-4'-metoxiflavona). Os derivados de crisoeriol eluem antes dos isómeros correspondentes de diosmetina.<sup>109</sup> Adicionalmente, a presença de um ião com  $m/z$  563 [(M-H)-30]<sup>-</sup> no composto **29** com uma abundância de 15% *versus* 2% no composto **25** (dados não mostrados na **Tabela 4**) confirma a presença de um grupo metoxilo em C-4' no composto **29**, caracterizando desta forma estes compostos como

crisoeriol-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido (**25**) e diosmetina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido (**29**).

### Flavonas mono-*C*-(*O*-glicosil)glicósido

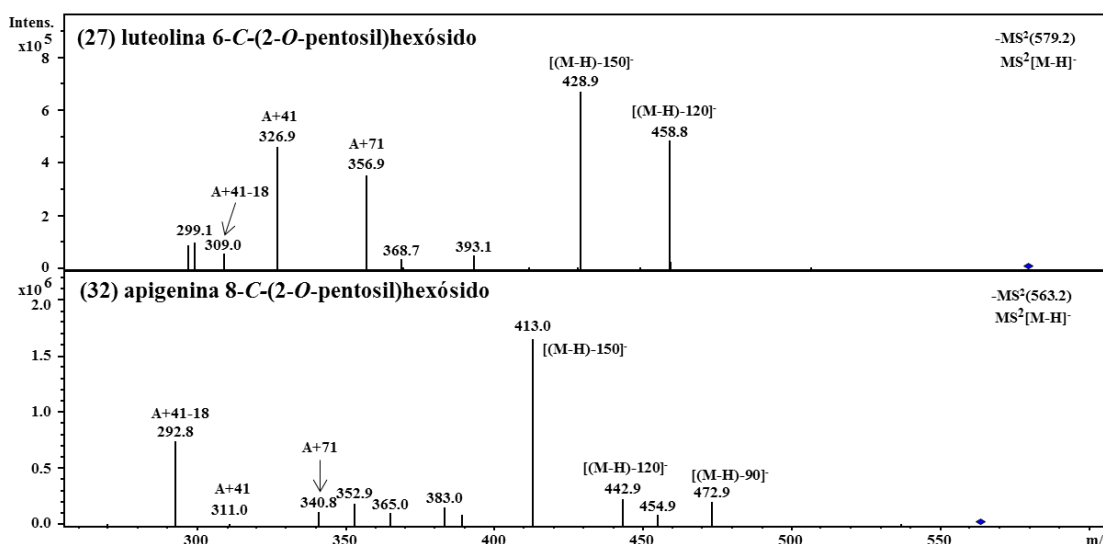
A fragmentação MS<sup>2</sup> dos compostos **11**, **16**, **27** e **32** apresenta iões [Aglc+71/41]<sup>-</sup> característicos de flavonoides mono-*C*-glicósidos. Uma vez que o seu ião [M-H]<sup>-</sup> é característico de flavonoides di-glicósidos estes compostos são flavonoides-*C*-glicosil-*O*-glicosilados (**Tabela 4**).

Os compostos **11** e **16** são a luteolina- e a apigenina-*C*-(*O*-hexosil)-hexósido, respetivamente, e os seus espectros de MS<sup>2</sup> não mostram nenhum fragmento entre o ião molecular desprotonado e o ião [Aglc+71]<sup>-</sup>, indicando *O*-glicosilação na posição 6 do açúcar que se encontra ligado ao carbono da aglicona, pois a ligação interglicosídica (1→6) é difícil de romper, observando-se apenas a clivagem interna do açúcar da *C*-glicosilação nas posições 0,2 para obter os iões [<sup>0,2</sup>X]<sup>-</sup> {[M-H]-(120+162)<sup>-</sup>, [Aglc+41]<sup>-</sup>} e [<sup>0,3</sup>X]<sup>-</sup> {[M-H]-(90+162)<sup>-</sup>, [Aglc+71]<sup>-</sup>}.<sup>48</sup> Portanto, estes compostos serão derivados 6"-*O*-hexosilados de **23/26** e **31/34**. A elevada abundância de **26** e **34** indica que podem ser tentativamente identificados como luteolina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido (**11**) e apigenina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido (**16**) (**Figura 26**).



**Figura 26.** Esquema de fragmentação MS em modo negativo de luteolina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido (**11**) e apigenina-6-*C*-(6-*O*-hexosil)hexósido (**16**).

No que diz respeito aos compostos **27** e **32**, além dos iões característicos de flavonas mono-*C*-glicosiladas, foi também observado um ião muito abundante  $[(M-H)-(132+18)]^-$  que indica a presença de uma pentose ligada a um grupo fenólico não-hidroxilo, pertencente assim ao açúcar envolvido na *C*-glicosilação (**Tabela 4**). A baixa abundância dos iões resultantes da fragmentação do açúcar da *C*-glicosilação no composto **32** sugere que este está localizado na posição 8, enquanto no composto **27** está localizado em C-6 (**Tabela 1, Figura 27**).

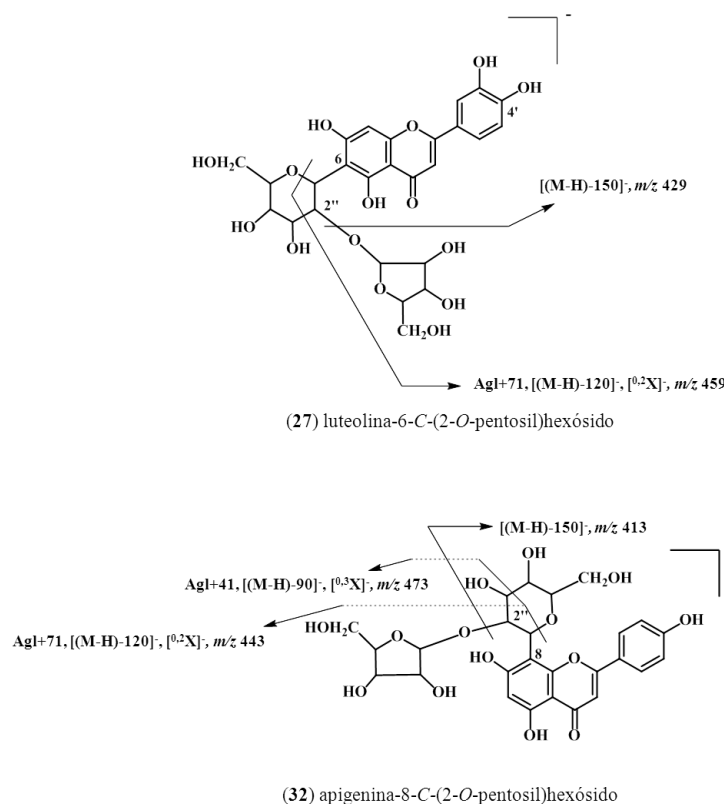


**Figura 27.** Análise MS<sup>2</sup> de  $[M-H]^-$  de luteolina-6-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**27**) e apigenina-8-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**32**).

A perda de 120 amu a partir do ião molecular desprotonado indica que as posições 3-6 do açúcar da *C*-glicosilação estão livres e, por conseguinte, a pentose está ligada ao grupo hidroxilo na posição 2 da hexose (**Figura 28**). Assim, estes compostos podem ser caracterizados como luteolina-6-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**27**) e apigenina-8-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**32**). Iwashina *et al.* (1999)<sup>21</sup> detetaram dois derivados *O*-glicosilados de orientina e isovitexina, assim como vitexina-X"-glicosídeo, que não coincidem com os caracterizados neste trabalho.

## Flavonas di-*C*-glicósido-*O*-glicosiladas

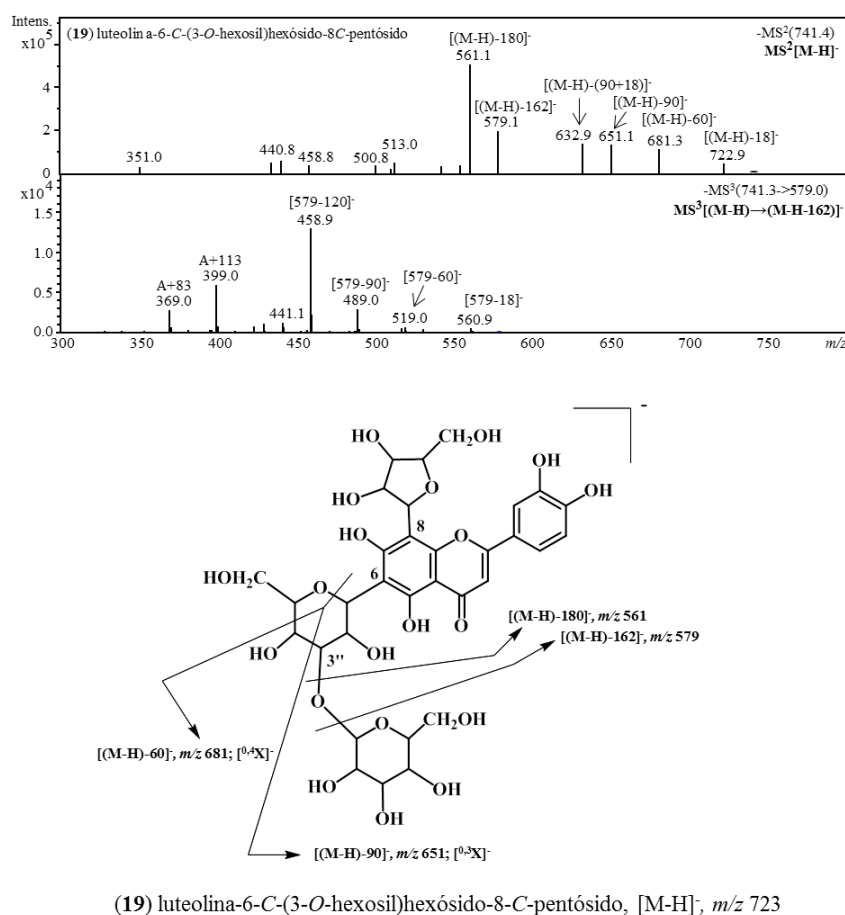
Neste trabalho foram também detetados quatro flavonoides triglicosilados (compostos **19**,  $[M-H]^-$   $m/z$  741; **8**, **28** e **30**,  $m/z$  725). A análise dos espectros de MS<sup>3</sup> possibilitou a identificação dos iões que caracterizam como derivados de aglíconas di-*C*-glicosiladas  $\{[Aglc+113/83]^-, \mathbf{19}: m/z$  399/369, luteolina; **8**, **28** e **30**:  $m/z$  383/353, apigenina $\}$  (dados presentes na nota de rodapé da **Tabela 4**). Tendo em conta as observações descritas, estes compostos são flavonoides di-*C*-glicosil-*O*-glicosilados. Para além de alguns iões resultantes da fragmentação dos açúcares da *C*-glicosilação, os espectros de MS<sup>2</sup> de **19**, **28** e **30** apresentaram os iões  $[(M-H)-162]^-$  e  $[(M-H)-180]^-$  em abundância elevada, indicando uma *O*-glicosilação com uma hexose de um hidroxilo não fenólico, isto é, uma ligação interglicosídica nos açúcares da *C*-glicosilação. Por outro lado, o ião  $[(M-H)-180]^-$  não foi observado no composto **8**, apontando para a *O*-glicosilação de um hidroxilo fenólico.<sup>48</sup>



**Figura 28.** Esquema de fragmentação MS no modo negativo de luteolina-6-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**27**) e apigenina 8-*C*-(2-*O*-pentosil)hexósido (**32**).



O espectro de  $MS^3$  do íon produzido pela perda do radical *O*-hexosilo  $\{MS^3[(M-H) \rightarrow (M-H-162)]\}^-$  do composto **19** (dados mostrados na nota de rodapé da **Tabela 4** e **Figura 29**, análise  $MS^3$ ) é característico de luteolina-6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido, com um pico base produzido pela perda de 120 amu ( $[(M-H-162)-120]^-$ ). No entanto, no seu espectro  $MS^2$  (**Tabela 4** e **Figura 29**, análise  $MS^2$ ) o íon  $[(M-H)-120]^-$  não foi observado, indicando que a *O*-glicosilação ocorre num hidroxilo da 6-*C*-hexose distinto da posição 2". A presença dos íões  $[(M-H)-90]^-$  e  $[(M-H)-60]^-$  indica que a posição da *O*-glicosilação é em C-3" (**Figura 29**). Desta forma, o composto **19** foi caracterizado como luteolina-6-*C*-(3-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido.



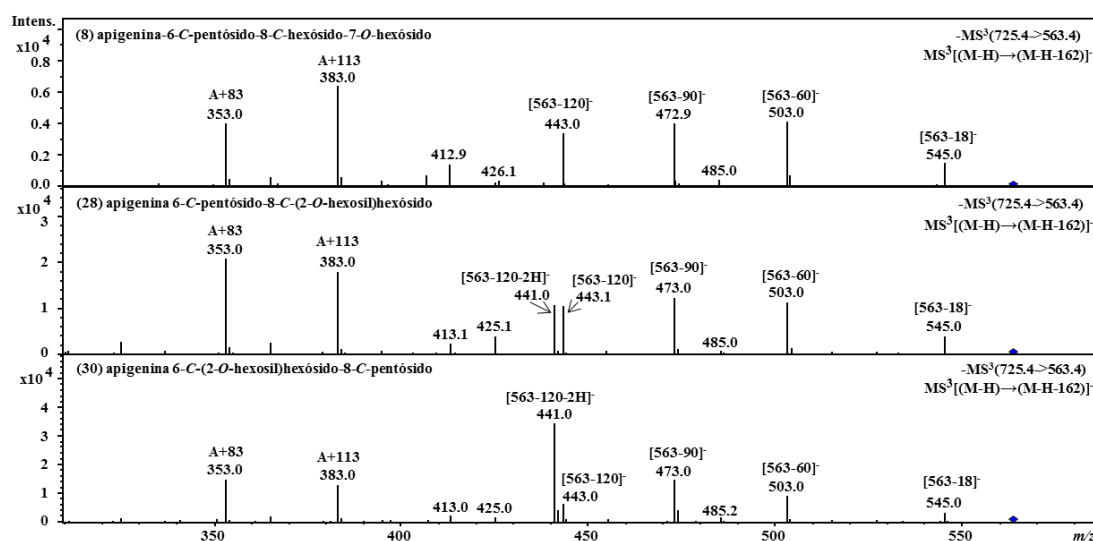
**Figura 29.** Análise  $MS^2$   $[M-H]^-$  e  $MS^3$   $[(M-H) \rightarrow (M-H-162)]^-$  e esquema de fragmentação no modo negativo de luteolína-6-*C*-(3-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido (**19**).

Da mesma forma como se fez com o composto **19**, na elucidação dos compostos **8**, **28** e **30** (derivados *O*-glicosilados de apigenina-*C*-hexósido-*C*-pentósido), analisaram-se os

dados resultantes do  $MS^3$  [(M-H)→(M-H-162)]<sup>-</sup> (dados presentes na nota de rodapé da **Tabela 4** e **Figura 30**, análise  $MS^3$ ), isto é, a fragmentação do ião produzido pela perda do radical *O*-hexosilo. A análise  $MS^3$  dos compostos **8** e **28** demonstra a presença de iões [(M-H)-60]<sup>-</sup> abundantes, o que é típico de um 6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido, enquanto o composto **30**, com um ião [(M-H)-120-2H]<sup>-</sup> abundante, corresponde a um 6-*C*-hexósido-8-*C*-pentósido. Assim, o composto **8**, o qual, como acima mencionado, apresenta uma *O*-glicosilação no hidroxilo fenólico (ausência de [(M-H)-180]<sup>-</sup>) pode ser tentativamente caracterizado como apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido-7-*O*-hexósido. Os compostos **28** e **30** são derivados *O*-glicosilados num dos açúcares da *C*-glicosilação, provavelmente no hidroxilo na posição 2 da hexose, podendo ser tentativamente identificados como apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido (**28**) e apigenina-6-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido (**30**).

### Flavonas *O*-glicosiladas

No final do cromatograma eluem três flavonoides *O*-glicosilados (**Figura 25**). De acordo com os espectros de UV e de MS foram caracterizados como luteolina-7-*O*-ramnosil(1→2)hexósido (**37**), crisoeriol-7-*O*-hexósido (**38**) e crisoeriol-7-*O*-ramnosil(1→6)hexósido (**39**) (**Tabela 4**).



**Figura 30.** Análise  $MS^3$  [(M-H)→(M-H-162)]<sup>-</sup> de apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-hexósido-7-*O*-hexósido (**8**), apigenina-6-*C*-pentósido-8-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido (**28**) e apigenina-6-*C*-(2-*O*-hexosil)hexósido-8-*C*-pentósido (**30**).

### 3.2. Validação de um método para a quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

A determinação do teor dos compostos fenólicos identificados nas amostras de *C. esculenta* requereu a validação de um método analítico de quantificação por HPLC-DAD. Desta forma, procedeu-se à análise de regressão linear utilizando curvas de calibração externa. As equações de regressão e os coeficientes de correlação são apresentados na **Tabela 5**. Todas as áreas dos picos dos analitos nas concentrações testadas apresentaram uma boa linearidade ( $r^2 \geq 0,98$ ). Na mesma tabela (**Tabela 5**) encontram-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) verificados experimentalmente pelas soluções-padrão. Os resultados obtidos indicam que o método de HPLC-DAD é suficientemente sensível e tem uma boa linearidade para a quantificação dos compostos fenólicos presentes em baixas concentrações nos extratos em estudo de *C. esculenta*.

**Tabela 5.** Equações de regressão linear, limites de detecção e limites de quantificação para análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD.

Composto	Equações de regressão linear	$r^2$ <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup> (µg/mL)	LOQ <sup>c</sup> (µg/mL)
Ácido cafeico	$2,18 \times 10^9 x - 1,93 \times 10^6$	0,99	0,05	0,16
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	$1,42 \times 10^9 x - 6,38 \times 10^5$	0,99	0,25	0,77
Ácido <i>p</i> -cumárico	$2,20 \times 10^9 x + 6,65 \times 10^5$	0,99	0,98	3,27
Apigenina-8- <i>C</i> -glucósido	$6,34 \times 10^8 x - 2,44 \times 10^4$	0,99	0,23	0,71
Apigenina-6- <i>C</i> -glucósido	$1,04 \times 10^9 x + 5,63 \times 10^4$	0,99	0,30	0,91
Luteolina-8- <i>C</i> -glucósido	$8,08 \times 10^8 x + 1,29 \times 10^6$	0,98	0,04	0,13
Luteolina-6- <i>C</i> -glucósido	$1,05 \times 10^9 x + 2,50 \times 10^6$	0,99	1,11	3,36
Apigenina-6- <i>C</i> -glucósido-7- <i>O</i> -glucósido	$7,70 \times 10^8 x + 2,95 \times 10^5$	0,99	0,01	0,03
Luteolina-3',7-di- <i>O</i> -glucósido	$6,63 \times 10^8 x + 5,38 \times 10^5$	0,99	0,11	0,33
Crisoeriol	$1,53 \times 10^9 x + 2,88 \times 10^5$	0,99	0,04	0,11

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação linear

<sup>b</sup> Limite de detecção.

<sup>c</sup> Limite de quantificação

As baixas variações intra- e inter-dia das áreas dos picos ( $\text{RSD}\% \leq 4,31$ ), assim como os testes de recuperação efetuados, indicam uma elevada precisão do sistema cromatográfico (**Tabela 6, Tabela 7**). Assim, o método HPLC-DAD desenvolvido para a quantificação de compostos fenólicos nas folhas de *C. esculenta* é adequado.

**Tabela 6.** Repetibilidade e precisão intermédia do método para a análise da composição fenólica por HPLC-DAD.

Composto	Repetibilidade (intra-dia)		Precisão intermédia (inter-dias)	
	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD <sup>a</sup> (%)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)
Ácido cafeico	4,13	0,39	16,50	0,71
	16,50	0,68		
	45,00	2,30		
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	5,63	1,68	45,00	3,11
	45,00	2,98		
	90,00	3,31		
Ácido <i>p</i> -cumárico	7,50	3,83	15,00	3,69
	15,00	3,67		
	30,00	3,64		
Apigenina-8- <i>C</i> -glucósido	2,30	3,04	4,70	2,35
	4,70	2,29		
	9,40	0,56		
Apigenina-6- <i>O</i> -glucósido	4,10	3,58	8,30	3,75
	8,30	4,12		
	16,50	3,42		
Luteolina-8- <i>C</i> -glucósido	8,50	0,21	17,00	1,23
	17,00	0,99		
	50,00	0,87		
Luteolin-6- <i>C</i> -glucósido	2,70	1,76	5,40	1,32
	5,40	1,74		
	11,00	4,17		
Apigenin-6- <i>C</i> -glucósido-7- <i>O</i> -glucósido	6,40	0,05	25,50	0,95
	25,50	0,97		
	51,00	1,69		
Luteolin-3',7-di- <i>O</i> -glucósido	6,88	0,56	27,50	2,03
	27,50	2,49		
	55,00	2,60		
Crisoeriol	1,03	1,14	8,25	3,97
	8,25	4,31		
	33,00	2,21		

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

**Tabela 7.** Ensaios de recuperação (exatidão).

Composto	Recuperação		
	Concentração (µg/mL)	Média (%)	RSD <sup>a</sup> (%)
Ácido cafeico	3,00	72,40	0,92
	8,00	133,90	4,49
	13,0	68,74	3,06
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,00	87,78	3,12
	8,00	79,14	4,49
	13,00	70,33	3,70
Apigenina-8- <i>C</i> -glucósido	2,00	116,50	3,27
	7,00	136,30	6,99
	12,00	85,44	4,54
Apigenina-6- <i>O</i> -glucósido	4,00	122,10	13,80
	9,00	123,10	15,30
	14,00	88,59	3,63
Luteolina-8- <i>C</i> -glucósido	2,00	97,34	7,43
	4,00	132,10	5,94
	6,00	71,72	3,66
Luteolina-6- <i>C</i> -glucósido	50,00	119,10	3,77
	100,00	118,60	2,94
	150,00	80,70	1,51

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

### 3.3. Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD

O método de HPLC-DAD permitiu a quantificação de 39 compostos fenólicos num único ensaio. O conteúdo dos compostos fenólicos dos extratos aquosos das variedades “branco gigante” e “vermelho” foram semelhantes, ca. 9 g / kg (peso seco) (**Tabela 8**), embora se tenham observado diferenças quantitativas para alguns compostos.

As três amostras de “inhame branco” analisadas apresentam um perfil fenólico qualitativamente diferente das duas amostras descritas acima, diferindo também na quantidade (ABS ca. 7 g/Kg), FAFB ca. 4 g/Kg e FAQ1 ca. 3 g/Kg). As diferenças quantitativas entre amostras da mesma variedade poderão dever-se aos diferentes tipos de cultura a que foram sujeitos.

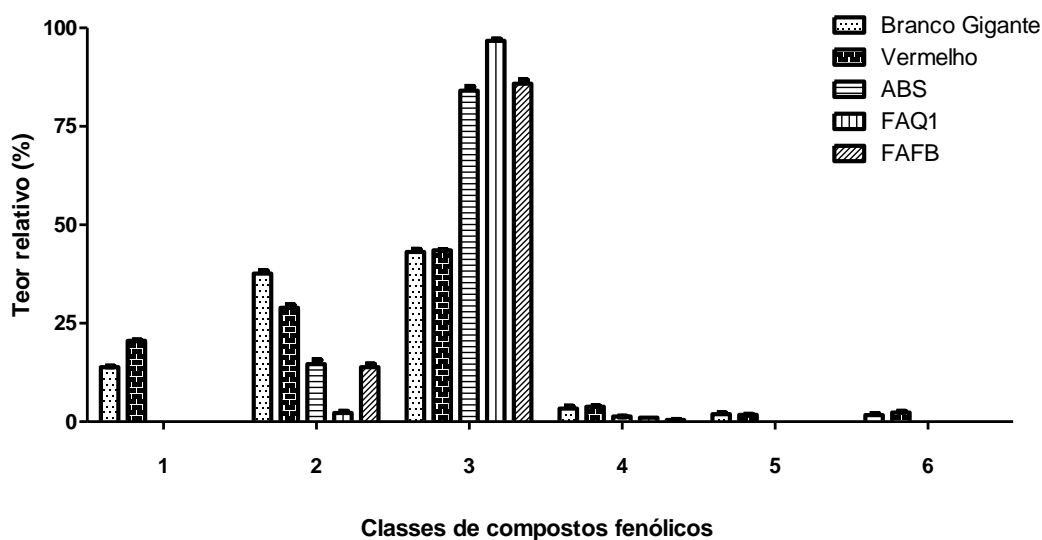
**Tabela 8.** Quantificação dos compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras de *C. esculenta* (mg/kg de peso seco)<sup>1</sup>.

Composto <sup>2</sup>		Concentração (mg/Kg )				
		Ácidos fenólicos				
		var “branco gigante”	var “vermelho”	ABS	FAQ1	FAFB
1	Der. ácido cafeico	119,89 ± 4,49 <sup>a</sup>	n.id. <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
2	Der. ácido cafeico	70,70 ± 1,94 <sup>a</sup>	61,96 ± 1,64 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
3	Der. ácido cafeico	158,06 ± 6,99 <sup>a</sup>	136,38 ± 6,79 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
4	Der. ácido cafeico	219,10 ± 9,79 <sup>a</sup>	171,67 ± 6,99 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
5	Der. ácido cafeico	155,41 ± 10,3 <sup>a</sup>	223,49 ± 21,14 <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
6	Der. ácido cafeico	212,87 ± 15,9 <sup>a</sup>	152,22 ± 11,63 <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
7	Sin Hex	n.q. <sup>a</sup>	n.q.	n.id.	n.id.	n.id.
10	Ácido cafeico	129,49 ± 2,25 <sup>a</sup>	58,19 ± 2,23 <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
20	Ácido <i>p</i> -Cum	139,17 ± 4,04 <sup>a</sup>	362,75 ± 36,02 <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
40	Der. ácido dihidrocaf quin	n.id.	286,16 ± 8,31 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
41	Der. ácido dihidrocaf quin	n.id.	213,61 ± 8,37 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
		Flavonas mono-C-glicósido				
23	Lut 8-C-Hex	833,37 ± 53,39 <sup>a</sup>	620,59 ± 16,75 <sup>b</sup>	89,04±4,79	46,31±3,41	45,98±1,04
26	Lut 6-C-Hex	1836,56 ± 100,77 <sup>a</sup>	1412,78 ± 76,61 <sup>b</sup>	76,61±2,21	n.id.	103,66±0,90
31	Api 8-C-Hex	160,78 ± 9,62 <sup>a</sup>	143,23 ± 9,13 <sup>a</sup>	584,48±15,31	20,89±2,82	273,93±12,70
34	Api 6-C-Hex	299,97 ± 15,14 <sup>a</sup>	289,84 ± 12,86 <sup>a</sup>	31,43±9,27	n.id.	13,88±1,02
35	Chrys 8-C-Hex	33,11 ± 0,33 <sup>a</sup>	n.q.	168,58±11,09	n.id.	105,19±11,68
36	Chrys 6-C-Hex	100,80 ± 5,35 <sup>a</sup>	95,99 ± 7,77 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
		Flavonas di-C-glicósido				
9	Lut 6,8-di-C-Hex	n.q. <sup>a</sup>	Quantificado c/41	n.id.	n.id.	n.id.
12	Lut 6-C-Hex-8-C-Pent	583,16 ± 4,39 <sup>a</sup>	662,06 ± 25,96 <sup>b</sup>	287,27±25,24	83,58±1,39	311,39±29,07
13	Api 6,8-di-C-Hex	n.q. <sup>a</sup>	65,18 ± 4,60 <sup>b</sup>	n.q.	n.q.	n.q.
14	Lut 6-C-Hex-8-C-Pent	996,87 ± 56,18 <sup>a</sup>	1087,87 ± 38,93 <sup>b</sup>	197,43±4,19	70,41±8,43	199,18±11,03
15	Lut 6-C-Pent-8-C-Hex	276,96 ± 15,44 <sup>a</sup>	283,96 ± 12,77 <sup>a</sup>	49,95±4,26	24,86±0,14	69,15±5,69
17	Api 6-C-Pent-8-C-Hex	43,04 ± 2,04 <sup>a</sup>	29,79 ± 0,31 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
18	Api 6-C-Pent-8-C-Hex	Quantificado c/17	Quantificado c/17	n.id.	n.id.	n.id.
21	Api 6-C-Pent-8-C-Hex	393,92 ± 27,29 <sup>a</sup>	446,78 ± 34,46 <sup>a</sup>	1433,39±22,64	666,66±46,31	769,11±41,73
22	Lut 6-C-Pent-8-C-Hex	750,51 ± 49,44 <sup>a</sup>	734,94 ± 37,41 <sup>a</sup>	2384,15±207,01	1251,22±71,39	1415,39±81,65
24	Api 6-C-Hex-8-C-Pent	328,15 ± 16,66 <sup>a</sup>	299,65 ± 8,15 <sup>a</sup>	801,01±36,14	420,99±28,24	521,98±9,75
25	Chrys 6-C-Hex-8-C-Pent	n.q. <sup>a</sup>	n.q.	n.id.	n.id.	n.id.
29	Diosmt 6-C-Hex-8-C-Pent	118,10 ± 7,58 <sup>a</sup>	142,89 ± 2,86 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
33	Api 6-C-Hex-8-C-Pent	232,42 ± 13,69 <sup>a</sup>	187,41 ± 15,77 <sup>a</sup>	487,69±5,41	257,48±17,21	303,58±20,12
		Flavonas mono-C-(O-glicosil)glicósido				
11	Lut 6-C-(6-O-Hex)Hex	119,79 ± 3,51 <sup>a</sup>	177,29 ± 6,38 <sup>b</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
16	Api 6-C-(6-O-Hex)Hex	Quantificado c/1	Quantificado c/17	n.id.	n.id.	n.id.
27	Lut 6-C-(2-O-Pent)Hex	Quantificado c/26	Quantificado c/26	n.id.	n.id.	n.id.
32	Api 8-C-(2-O-Pent)Hex	151,94 ± 5,52 <sup>a</sup>	164,97 ± 15,92 <sup>a</sup>	84,69±6,32	29,72±1,44	16,9±0,75
		Flavonas di-C-(O-glicosil)glicósido				
8	Api 6-C-Pent-8-C-Hex-7-O-Hex	n.q. <sup>a</sup>	n.q. <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
19	Lut 6-C-(3-O-Hex)Hex-8-C-Pent	Quantificado c/17	Quantificado c/17	n.id.	n.id.	n.id.
28	Api 6-C-Pent-8-C-(2-O-Hex)Hex	149,49 ± 4,56 <sup>a</sup>	152,61 ± 4,14 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
30	Api 6-C-(2-O-Hex)Hex-8-C-Pent	Quantificado c/29	Quantificado c/29	n.id.	n.id.	n.id.
		Flavonas O-glicósido				
37	Lut 7-O-Rhmn(1→2)Hex	60,04 ± 4,27 <sup>a</sup>	38,89 ± 2,82 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
38	Chrys 7-O-Hex	n.q. <sup>a</sup>	n.q.	n.id.	n.id.	n.id.
39	Chrys 7-O-Rhmn(1→6)Hex	80,28 ± 2,11 <sup>a</sup>	107,77 ± 5,31 <sup>a</sup>	n.id.	n.id.	n.id.
Σ		8770,573	9100,89	6675,72	2938,45	4149,36

<sup>1</sup> Os resultados estão expressos em média de 3 determinações (desvio padrão); n.q., não quantificável; n.id., não identificável; diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas (p < 0.05).

<sup>2</sup> *p*-Cum, *p*-cumárico; Sin, sinapóil; Dihidrocaf, dihidrocafeol; Lut, luteolina; Api, apigenina; Cris, crisoeiril; Diosmt, diosmetina; Hex, hexósido; Pent, pentósido; e Ramn, ramnósido

O inhame vermelho e o inhame branco gigante possuem ácidos fenólicos, flavonas mono-*C*-glicosiladas, flavonas di-*C*-glicosiladas, flavonas mono-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas, flavonas di-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas e flavonas-*O*-glicosiladas. No entanto a variedade de inhame “branco” (ABS, FAQ e FAFB) apenas apresenta flavonas mono-*C*-glicosiladas, flavonas di-*C*-glicosiladas e flavonas mono-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas (**Figura 31**).



**Figura 31.** Teor relativo em relação ao conteúdo total das diferentes classes de compostos fenólicos presentes nas diferentes variedades de *C. esculenta*. Classes de compostos fenólicos: (1) ácidos fenólicos, (2) flavonas mono-*C*-glicosiladas, (3) flavonas di-*C*-glicosiladas, (4) flavonas mono-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas, (5) flavonas di-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas e (6) flavonas-*O*-glicosiladas.

O perfil fenólico das variedades "branco gigante" e "vermelho" contém, respectivamente, cerca de ca. 14 e 21% ácidos hidroxicinâmicos, 37 e 28% flavonas-mono-*C*-glicosiladas, 42 e 43% de flavonas-di-*C*-glicosiladas, 3 e 4% de flavonas-mono-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas, ambos ca. 2% de flavonas-di-*C*-(*O*-glicosil)glicosiladas e 2% de flavonas-*O*-glicosiladas (**Figura 31**).

Tanto quanto sabemos, esta é a primeira vez que a ocorrência de derivados de ácidos hidroxicinâmicos em folhas de *C. esculenta* é descrita. Num trabalho anterior,

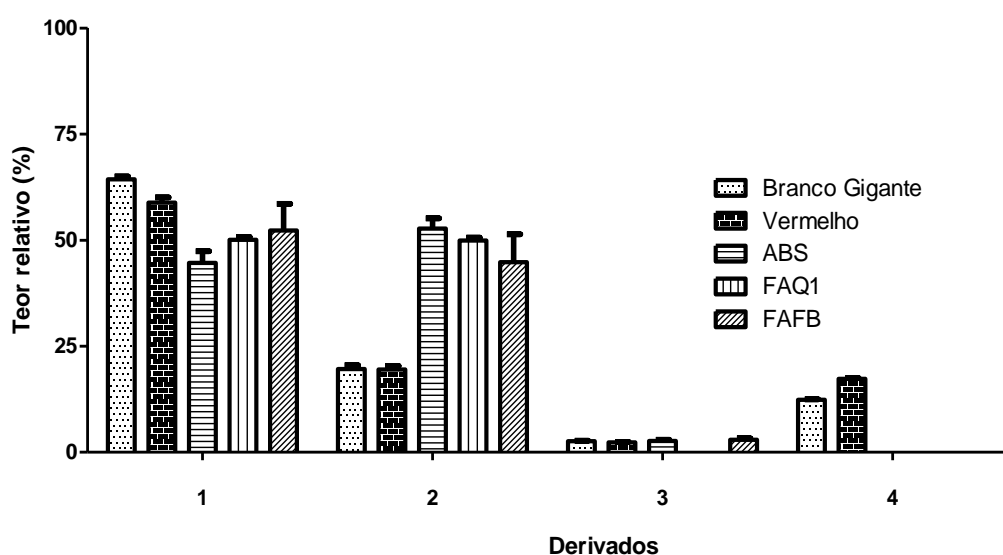
Champagne *et al.* (2011)<sup>106</sup> apenas encontraram vestígios de derivados de ácido 5-cafeoilquínico no tubérculo.

As amostras FAFB e ABS da variedade de inhame “branco” possuem perfis fenólicos quantitativos muito semelhantes, uma vez que o teor relativo em flavonas mono-C-glicosiladas é aproximadamente 13 e 14%, respetivamente, e em flavonas di-C-glicosiladas é ca. 87 e 85 % , respetivamente.

O perfil fenólico da amostra FAQ1 é maioritariamente constituído por flavonas di-C-glicosiladas (ca. 97%), sendo o teor relativo dos compostos pertencentes às duas outras classes que constituem este perfil fenólico muito baixo (flavonas mono-C-glicosiladas: ca. 2%; flavonas-mono-C-(O-glicosil)glicosiladas: ca. 1%) .

Os compostos derivados da luteolina predominam nas três variedades de inhame dos Açores, enquanto os derivados da apigenina existem em quantidades mais significativas nas amostras de inhame branco (**Figura 32**).

Os compostos derivados do crisoeriol existem em quantidades pouco significativas nas três variedades.



**Figura 32.** Teor relativo em relação ao conteúdo total dos diferentes derivados de compostos fenólicos presentes nas diferentes variedades de *C. esculenta*. Derivados de (1) luteolina; (2) apigenina; (3) crisoeriol; (4) ácidos hidroxicinâmicos.



Os derivados de apigenina, de luteolina e de crisoeriol representam ca. 20, 64 e 3% dos flavonoides determinados na variedade "branco gigante", respetivamente, enquanto no inhame "vermelho", eles correspondem a ca. 20, 57 e 2%, respetivamente.

No que diz respeito às amostras de inhame “branco” analisadas, os derivados de apigenina representam ca. 50% do perfil fenólico de FAQ1 e FAFB e ca. 40% da amostra ABS. Já os derivados de luteolina encontram-se em maior quantidade nas amostras ABS e FAQ1 (ca 50% em ambas), sendo ca. 40% do perfil fenólico da amostra FAFB. Os derivados de crisoeriol estão presentes apenas nas amostras ABS e FAFB (ca. 3% em ambas).

A luteolina-6-C-hexósido (**26**) é o composto maioritário nas variedades “branco gigante” e “vermelho”, representando ca. 21 e 16% dos compostos fenólicos determinados nestas variedades, respetivamente. Ao contrário do observado neste trabalho, o composto maioritário identificado nas folhas de uma outra variedade de *C. esculenta* (var. *aquatilis*)<sup>11</sup> foi a apigenina-6-C-glicósido (**34**). Ao submeter o perfil fenólico das variedades “branco gigante” e “vermelho” a análise estatística, esta demonstrou que a concentração dos compostos **1**, **6**, **10**, **23** e **26** foi significativamente maior na variedade "branco gigante", enquanto o inhame "vermelho" apresentou teores consideravelmente mais altos dos compostos **5**, **11-14** e **20**.

Nas amostras da variedade de inhame “branco” os três compostos fenólicos com teor superior são, por ordem decrescente, a luteolina-6-C-pentósido-8-C-hexósido (**22**), a apigenina-6-C-pentósido-8-C-hexósido (**21**) e a apigenina-6-C-hexósido-8-C-hexósido (**24**). Estes compostos representam mais de metade da concentração total de fenóis nestas variedades (ca. 80% para a amostra FAQ1 e 70% para as amostras ABS e FAFB).

A concentração dos compostos **21**, **22**, **24**, **33**, e **35** é maior nas amostras de inhame “branco”, sendo a amostra ABS a que contém maior quantidade. Esta amostra é cultivada sem rega, por isso seria de esperar que, quando comparado com as amostras FAQ1 e FAFB, possuísse maior quantidade de compostos fenólicos. Geralmente, uma redução no fornecimento de água aumenta o conteúdo em compostos fitoquímicos, nomeadamente de compostos fenólicos.<sup>110</sup> Desta forma os resultados obtidos seriam expectáveis. Relativamente à amostra FAQ1, observamos que o tratamento com água quente, não só diminui a quantidade de compostos fenólicos sintetizados pela planta, como também a sua

variabilidade, uma vez que, como já descrito atrás, o perfil fenólico desta amostra é constituído maioritariamente por flavonas di-*C*-glicosiladas.

Como acima mencionado, foram já descritas algumas flavonas em diferentes variedades desta espécie.<sup>11, 21</sup> Por outro lado, Lako e seus colaboradores observaram a presença de flavonóis nas folhas de *C. esculenta*.<sup>22</sup> A fração fenólica dos tubérculos de *C. esculenta* de Vanuatu foi também descrita como sendo rica em flavonóis como hiperósido, isoramnetina-3-*O*-glucósido, e flavanóis, tais como catequina e epicatequina.<sup>107</sup> Tendo em conta as observações descritas para outras variedades de inhame, e dado que as três variedades de *C. esculenta* “branco gigante”, “vermelho” e amostra FAFB de “branco”, partilham a mesma localização geográfica, com condições de rega semelhantes, pode-se especular a existência de uma variabilidade química qualitativa e quantitativa infraespecífica em *C. esculenta*.

### 3.4. Atividade antioxidante

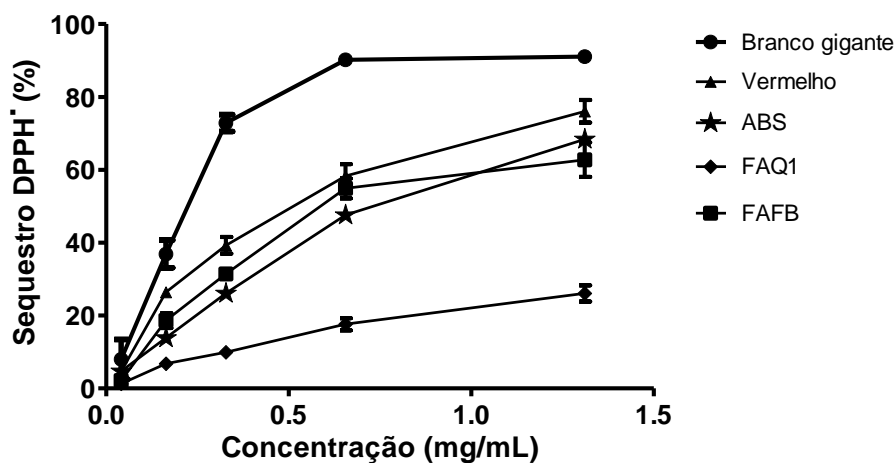
O potencial antioxidante das diferentes variedades de inhame dos Açores foi avaliado contra os radicais DPPH, anião superóxido e óxido nítrico. A **Tabela 9** apresenta os valores da concentração necessária para inibir 50% da reação (IC<sub>50</sub>) dos três ensaios.

**Tabela 9.** Valores de IC<sub>50</sub> dos três ensaios realizados.

Amostras	IC <sub>50</sub> (mg/mL)		
	DPPH <sup>•</sup>	•NO	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Branco Gigante	0,231	1,246	0,119
Vermelho	0,535	0,392	0,133
ABS	0,748	1,181	0,110
FAQ1	1,228*	1,122	0,164
FAFB	0,733	1,316	0,068
Ácido ascórbico	0,067	0,214	0,371

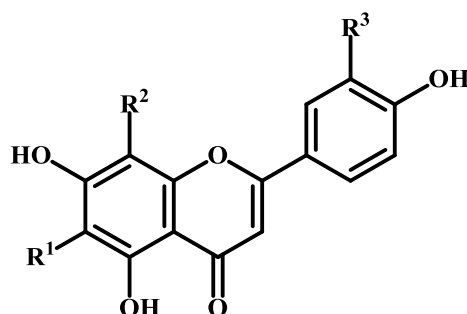
\* O valor corresponde ao IC<sub>25</sub>

As **Figuras 33, 34 e 35** relacionam a capacidade de sequestro dos radicais livres estudados em função da concentração da amostra.



**Figura 33.** Curva dose-resposta das diferentes variedades de *C. esculenta* contra o radical DPPH. Os resultados obtidos são expressos na forma de média +/- desvio padrão de 3 determinações.

A variedade “branco gigante” possui capacidade para sequestrar o radical DPPH significativamente superior às outras duas variedades. As amostras de inhame “branco” FAFB e ABS apresentam uma atividade similar. O inhame “branco” FAQ1 apresenta a atividade mais baixa. Estes resultados podem dever-se principalmente à existência ou não de flavonas mono-*C*-glicósidos. Em trabalhos anteriores foi já descrita uma elevada atividade destes compostos para sequestrar o DPPH<sup>•</sup>.<sup>11</sup> O inhame “branco gigante” apresenta um conteúdo total de compostos fenólicos menor que o inhame vermelho, mas é a variedade que contém maior quantidade de flavonas mono-*C*-glicosiladas, nomeadamente derivados de luteolina (orientina e isoorientina). A orientina e a isoorientina apresentam uma grande capacidade de sequestração do DPPH<sup>•</sup>, uma vez que são di-hidroxiladas nas posições 3' e 4' do anel B, formando um grupo catecol altamente reativo.<sup>92, 95</sup> Os seus correspondentes derivados da apigenina (vitexina e isovitexina) apenas apresentam um substituinte hidroxilo em 4', apresentando por esse motivo uma atividade inferior (**Figura 34**).<sup>111, 112</sup>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Orientina (luteolina-8- <i>C</i> -glucósido)	H	glucose	OH
Isoorientina (luteolina-6- <i>C</i> -glucósido)	glucose	H	OH
Vitexina (apigenina-8- <i>C</i> -glucósido)	H	glucose	H
Isovitexina (apigenina-6- <i>C</i> -glucósido)	glucose	H	H

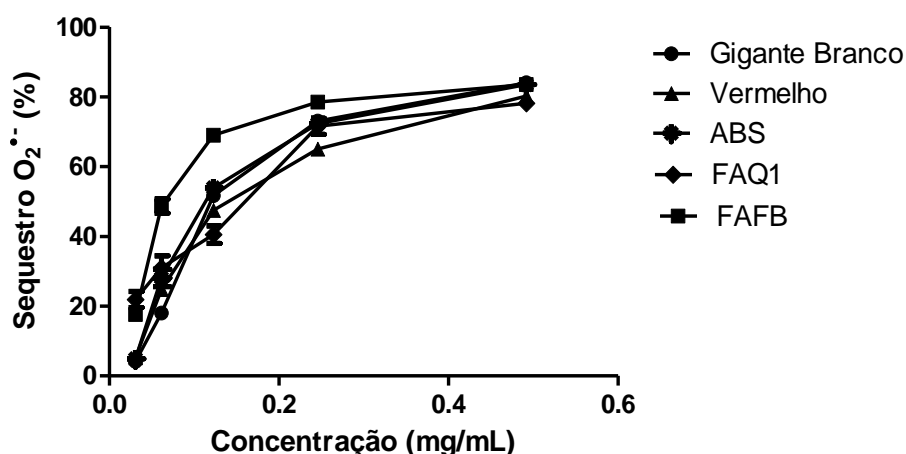
**Figura 34.** Estrutura química de quatro flavonas mono-*C*-glicosiladas.

Não poderemos descurar a atividade dos outros compostos descritos neste trabalho; contudo, as análises qualitativa e quantitativa mostram que, provavelmente, estes compostos não terão grande influência nas diferenças de atividade entre amostras. Os ácidos fenólicos estão também descritos como agentes antioxidantes.<sup>95</sup> Estes foram apenas

encontrados nas variedades “branco gigante” e “vermelho”, sendo esta última a variedade que contém maior quantidade destes compostos mas uma atividade menor. No que diz respeito a flavonas di-*C*-glicosiladas, a análise quantitativa demonstrou que a variedade “branco” é a que contém uma quantidade superior. Por outro lado, a atividade das amostras desta variedade é muito inferior à das variedades “branco gigante” e “vermelho”. O aumento da glicosilação aumenta o impedimento estérico,<sup>89</sup> logo, as flavonas di-*C*-glicosiladas serão menos ativas que as mono-*C*-glicosiladas. Adicionalmente, a *C*-glicosilação, em particular na posição 8, diminui a atividade dos compostos fenólicos, uma vez que provoca uma distorção na molécula, afetando a coplanaridade, dificultando a estabilização do radical fenóxilo.<sup>112</sup> Todas as flavonas di-*C*-glicosiladas identificadas neste trabalho são substituídas na posição 8.

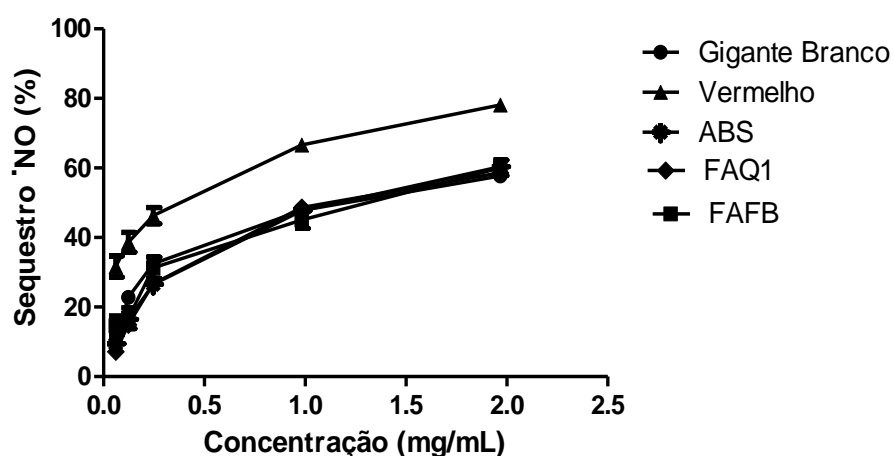
Assim, será possível conjecturar que a maior atividade da variedade de inhame “branco gigante” poderá dever-se ao maior teor das flavonas mono-*C*-glicosiladas derivadas de luteolina. A ausência ou a pouca quantidade destes compostos no inhame “branco” pode também explicar uma menor atividade das amostras ABS, FAFB e FAQ1, com especial relevância para a amostra FAQ1.

Comparando com ácido ascórbico, a atividade de sequestro do DPPH<sup>•</sup> destas amostras é significativamente inferior.



**Figura 35.** Curva dose-resposta das diferentes variedades de *C. esculenta* contra o radical superóxido. Os resultados obtidos são expressos na forma de média +/- erro padrão de 3 determinações.

As diferentes variedades de inhame dos Açores apresentam uma considerável atividade de sequestro do  $O_2^{\bullet-}$ , sendo até superior ao antioxidante de referência usado, o ácido ascórbico. Contudo, ao contrário dos resultados obtidos para o sequestro do  $DPPH^{\bullet}$ , não é possível especular nenhuma relação destes resultados com o perfil fenólico das diferentes variedades. Apesar desta atividade se dever provavelmente a outro tipo de compostos presentes nos extratos analisados, os compostos fenólicos poderão exercer um efeito sinérgico, muito provavelmente reciclando radicais de outros metabolitos antioxidantes.<sup>113, 114</sup>



**Figura 36.** Curva dose-resposta das diferentes variedades de *C. esculenta* contra o radical óxido nítrico. Os resultados obtidos são expressos na forma de média +/- erro padrão de 3 determinações.

O inhame “vermelho” apresenta potencial antioxidante contra o radical óxido nítrico consideravelmente superior ao das outras duas variedades, que apresentam capacidade semelhante. Mais uma vez o conteúdo de compostos fenólicos parece não ter influência na atividade das diferentes variedades. A amostra FAQ1 de inhame “branco” é a que apresenta a segunda maior atividade de sequestro deste radical, sendo a que contém um perfil fenólico qualitativo e quantitativo menor. Logo, provavelmente outros compostos não identificados poderão estar envolvidos na atividade antioxidante das diferentes variedades.

Assim como para o sequestro do  $DPPH^{\bullet}$ , a atividade das amostras consideradas contra o  $^{\bullet}NO$  é significativamente inferior à do antioxidante ácido ascórbico.

## 4. Conclusões

Do estudo realizado visando a valorização da cultura do inhame no arquipélago dos Açores, foi possível retirar as seguintes conclusões:

- A caracterização das diferentes variedades por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> permitiu a identificação de 41 compostos fenólicos, 34 dos quais foram identificados pela primeira vez nesta espécie.
- A aplicação de um método de quantificação reprodutível por HPLC-DAD demonstrou a existência de diferenças qualitativas e quantitativas entre as diversas variedades estudadas. Este resultado permitir-nos-á concluir que a análise do perfil fenólico poderá ser uma ferramenta importante na discriminação de diferentes variedades desta planta.
- O mesmo método demonstrou a existência de diferenças qualitativas e quantitativas entre os diferentes tipos de cultura a que uma mesma variedade de inhame foi sujeita, levando-nos a concluir que a cultura de sequeiro induz o aumento da produção de compostos fenólicos nesta planta. Por outro lado, a cultura de inhame com água quente diminui qualitativamente e quantitativamente a produção desses mesmos compostos fenólicos.
- A avaliação da atividade antioxidante das três variedades contra os radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e óxido nítrico (<sup>•</sup>NO) demonstrou que o extrato de *C. esculenta* apresenta maior potencial antioxidante contra o radical superóxido, sendo superior à atividade antioxidante do ácido ascórbico, que é um antioxidante natural exógeno importante no sistema fisiológico humano.
- O perfil fenólico das diferentes variedades está diretamente relacionado com o sequestro do radical DPPH. De uma forma geral a variedade “branco gigante” apresenta maior quantidade de compostos fenólicos, nomeadamente os mais ativos (flavonas mono-*C*-glicosiladas), apresentando também uma maior atividade contra o radical DPPH. Por outro lado a variedade “branco” FAQ1 é a que apresenta um

perfil fenólico mais pobre, apresentando uma atividade contra o DPPH<sup>•</sup> também menor.

- Não foi possível estabelecer o mesmo tipo de relação relativamente à capacidade de sequestro de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e <sup>•</sup>NO. Provavelmente outros compostos não detetados estarão envolvidos no sequestro destas espécies, não negligenciando totalmente a influência dos compostos fenólicos, uma vez que estes poderão exercer efeitos sinérgicos com outros compostos antioxidantes.
- A propriedade de reparação de lesões dérmicas atribuída à *C. esculenta* poderá estar relacionada com a sua capacidade de sequestro do radical superóxido. No entanto, outros estudos deverão ser desenvolvidos, uma vez que existem outras etapas no processo de reparação deste tipo de lesões e outros mecanismos de ação nos quais os constituintes desta planta poderão estar envolvidos.

## **Perspetivas futuras**

Seguindo uma outra linha de investigação, testou-se a capacidade do inhame para inibir a enzima acetilcolinesterase, que está envolvida na doença de Alzheimer, e a enzima hialuronidase, que está envolvida também no processo de reparação de lesões e em processos alérgicos. Os resultados obtidos a partir destes ensaios permitiram concluir que os fenóis presentes no inhame não possuem a capacidade para inibir estas enzimas. Futuramente outros ensaios avaliando outros mecanismos de ação irão ser executados com o objetivo de atestar cientificamente as propriedades terapêuticas desta planta.





## **Bibliografia**



## 5. Bibliografia

1. Butler, M. S., The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (12), 2141-2153.
2. Sekhon, B. S., Enantioseparation of Chiral Drugs – An Overview. *Int. J. Chem. Tech. Res.* **2010**, 2 (2), 1584-1594.
3. Ullah, M.; Khan, M., Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2008**, 9, 187-196.
4. Prajapati, R.; Kalariya., M.; Umbarkar, R.; Parmar, S.; Sheth, N., *Colocasia esculenta*: A potent indigenous plant. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* **2011**, 1, 90-96.
5. Brown, A. C.; Valiere, A., The medicinal uses of poi. *Nutr. Clin. Care* **2004**, 7 (2), 69-74.
6. Frutuoso, G., Saudades da Terra Vol. I. *Ponta Delgada, Portugal: Instituto Cultural de Ponta Delgada* **1998**.
7. Oscarsson, K. V.; Savage, G. P., Composition and availability of soluble and insoluble oxalates in raw and cooked taro (*Colocasia esculenta* var. Schott) leaves. *Food Chem.* **2007**, 101 (2), 559-562.
8. Irwin, S. V.; Kaufusi, P.; Banks, K.; de la Peña, R.; Cho, J. J., Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. *Euphytica* **1998**, 99 (3), 183-189.
9. Sahoo, M.; DasGupta, M.; Kole, P.; Bhat, J.; Mukherjee, A., Antioxidative enzymes and isozymes analysis of taro genotypes and their implications in *Phytophthora* blight disease resistance. *Mycopathologia* **2007**, 163 (4), 241-248.
10. Ejoh, A. R.; Mbiapo, F. T.; Fokou, E., Nutrient composition of the leaves and flowers of *Colocasia esculenta* and the fruits of *Solanum melongena*. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1996**, 49 (2), 107-112.
11. Leong, A. C.-N.; Kinjo, Y.; Tako, M.; Iwasaki, H.; Oku, H.; Tamaki, H., Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). *Food Chem.* **2010**, 119 (2), 630-635.
12. Rao, V. R.; Matthews, P. J.; Eyzaguirre, P. B.; Hunter, D., The global diversity of taro. Ethnobotany and conservation. Rome: *Bioversity International*. **2010**.

13. Lewu, M. N.; Adebola, P. O.; Afolayan, A. J., Effect of cooking on the mineral contents and anti-nutritional factors in seven accessions of *Colocasia esculenta* (L.) Schott growing in South Africa. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23* (5), 389-393.
14. Huang, C.-C.; Chen, W.-C.; Wang, C.-C. R., Comparison of Taiwan paddy- and upland-cultivated taro (*Colocasia esculenta* L.) cultivars for nutritive values. *Food Chem.* **2007**, *102* (1), 250-256.
15. Alain-Michel, B., Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22-24), 2722-2735.
16. Nair, R. B.; Bastress, K. L.; Ruegger, M. O.; Denault, J. W.; Chapple, C., The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **2004**, *16* (2), 544-554.
17. Abad-García, B.; Berrueta, L. A.; Garmón-Lobato, S.; Gallo, B.; Vicente, F., A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (28), 5398-5415.
18. Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52* (4), 673-751.
19. Truchado, P.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F. A., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (43), 7241-7248.
20. Ghan, H. T.; Kao-Jao, T. H. C.; Nakayama, T. O. M., Anthocyanin composition of taro. *J. Food Sci.* **1977**, *42* (1), 19-21.
21. Iwashina, T.; Konishi, T.; Takayama, A.; Fukada, M.; Ootani, S., Isolation and identification of the flavonoids in the leaves of taro. *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* **1999**, *18*, 71-74.
22. Lako, J.; Trenerry, V. C.; Wahlqvist, M.; Wattanapenpaiboon, N.; Sotheeswaran, S.; Premier, R., Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem.* **2007**, *101* (4), 1727-1741.

23. Metzler, D. E., Biochemistry: The chemical reactions of living cells, 2nd ed. New York: *Elsevier Academic Press* **2001**, vol. 1 e 2.
24. Seigler, D. S., Plant secondary metabolism. Massachusetts: *Kluwer Academic Publishers* **1998**.
25. Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>e</sup> édition. Paris: *Éditions Tec & Doc* **1999**.
26. Samuelsson, G.; Bohlin, L., Drugs of natural origin. A treatise of pharmacognosy. Stockholm: *Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutica Press*. **2009**.
27. Seabra, R. M.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Bastos, M. L., Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*; Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Eds.; Enfield: *Science Publishers*. **2006**, pp. 115-174.
28. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **2006**, 99 (1), 191-203.
29. Robbins, R. J., Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (10), 2866-2887.
30. Vermeir, W.; Nicholson, R., Phenolic compounds biochemistry. West Laffayette: *Springer* **2006**.
31. Buer, C. S.; Imin, N.; Djordjevic, M. A., Flavonoids: New roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, 52 (1), 98-111.
32. Aron, P. M.; Kennedy, J. A., Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52 (1), 79-104.
33. Grotewold, E., The science of flavonoids. New York: *Springer Science + Business Media, Inc.* **2006**.
34. Valentão, P., Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra. Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora [dissertação] Porto: *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*. **2002**.
35. Winkel-Shirley, B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126 (2), 485-493.

36. Aglika, E., Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2005**, *106* (2-3), 119-133.
37. Iwashina, T., Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biol. Sci. Space* **2003**, *17* (1), 24-44.
38. Agati, G.; Tattini, M., Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* **2010**, *186* (4), 786-793.
39. Markham, K. R., Techniques of flavonoid identification; London: *Academic Press*. **1982**.
40. Niessen, W. M. A., Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, 3rd ed. Boca Raton: *Taylor & Francis Group*. **2006**.
41. Sadek, P. C., Illustrated pocket dictionary of chromatography. New Jersey: *John Wiley & Sons, Inc.* **2004**.
42. Andersen, M.; Markham, K. R., Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: *Taylor & Francis Group*. **2006**.
43. de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T., Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112* (1-2), 31-63.
44. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B., The systematic identification of flavonoids. New York: *Springer*. **1970**.
45. Merken, H. M.; Beecher, G. R., Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (3), 577-599.
46. Lavagnini, I.; Magno, F.; Seraglia, R.; Traldi, P., Quantitative applications of mass spectrometry. London: *John Wiley & Sons Ltd.* **2006**.
47. Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39* (1), 1-15.
48. Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Tomás-Barberán, F. A., Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161* (1-2), 214-223.
49. Abrankó, L.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A., In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (5), 478-488.

50. Sousa, C. S. F., Perfil metabólico e potencial antioxidante de *Brassica oleracea* var. *costata* [dissertação]. Porto: *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*. **2009**.
51. de Rijke, E.; Zappey, H.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T., Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J. Chromatogr. A* **2003**, 984 (1), 45-58.
52. Ma, Y. L.; Li, Q. M.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M., Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11 (12), 1357-1364.
53. McNab, H.; Ferreira, E. S. B.; Hulme, A. N.; Quye, A., Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids - An isotopic labelling study. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 284 (1-3), 57-65.
54. Fabre, N.; Rustan, I.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. L., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12 (6), 707-715.
55. Cuyckens, F.; Ma, Y., L.; Pocsfalvi, G.; Claeys, M., Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analisis* **2000**, 28 (10), 888-895.
56. Gradolatto, A. I.; Canivenc-Lavier, M.-C.; Basly, J.-P.; Siess, M.-H. L. N.; Teyssier, C., Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, 32 (1), 58-65.
57. Domon, B.; Costello, C. E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **1988**, 5 (4), 397-409.
58. Stobiecki, M., Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* **2000**, 54 (3), 237-256.
59. Hvattum, E.; Ekeberg, D., Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2003**, 38 (1), 43-49.



60. Sakushima, A.; Nishibe, S.; Brandenberger, H., Negative ion desorption chemical ionization mass spectrometry of flavonoid glycosides. *Biol. Mass Spectrom.* **1989**, *18* (9), 809-815.
61. Becchi, M.; Fraisse, D., Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. *Biol. Mass Spectrom.* **1989**, *18* (2), 122-130.
62. Li, Q. M.; Van den Heuvel, H.; Dillen, L.; Claeys, M., Differentiation of 6-C- and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21* (4), 213-221.
63. Waridel, P.; Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hobby, K. R.; Major, H. J.; Hostettmann, K., Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *J. Chromatogr. A* **2001**, *926* (1), 29-41.
64. Willcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L., Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44* (4), 275-295.
65. Rahman, K., Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* **2007**, *2* (2), 219-236.
66. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (1), 44-84.
67. Mangialasche, F.; Polidori, M. C.; Monastero, R.; Ercolani, S.; Camarda, C.; Cecchetti, R.; Mecocci, P., Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res. Rev.* **2009**, *8* (4), 285-305.
68. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford: *Oxford University Press*. **1999**.
69. Estévez, A. G.; Jordán, J., Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *962* (1), 207-211.
70. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160* (1), 1-40.
71. Kehrer, J. P., The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **2000**, *149*, 43-50.

72. Jaimes, E. A.; Sweeney, C.; Raij, L., Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension* **2001**, 38, 877-883.
73. Chen, S.-X.; Schopfer, P., Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 260 (3), 726-735.
74. Pratt, D. A.; Tallman, K. A.; Porter, N. A., Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (6), 458-467.
75. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser, J., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* **2004**, 266 (1), 37-56.
76. Spiteller, G., Peroxy radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 41, 362-387.
77. Hannig, J.; Lee, R. C., Structural changes in cell membranes after ionizing electromagnetic field exposure. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2000**, 28 (1), 97-101.
78. Cejas, P.; Casado, E.; Belda-Iniesta, C.; De Castro, J.; Espinosa, E.; Redondo, A.; Sereno, M.; García-Cabezas, M. Á.; Vara, J. A. F.; Domínguez-Cáceres, A.; Perona, R.; González-Barón, M., Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control* **2004**, 15 (7), 707-719.
79. Gülçin, İ., Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* **2012**, 86 (3), 345-391.
80. Drew, B.; Leeuwenburgh, C., Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2002**, 959, 66-81.
81. Pacher, P. I.; Beckman, J. S.; Liaudet, L., Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **2007**, 87 (1), 315-424.
82. Bergendi, L.; Beneš, L.; Ďuračková, Z.; Ferenčík, M., Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* **1999**, 65 (18/19), 1865-1874.
83. Singh, S.; Singh, R. P., In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Rev. Int.* **2008**, 24 (4), 392-415.
84. Armstrong, R. N., Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10 (1), 2-18.

85. Aon, M. A.; Cortassa, S.; Maack, C.; O'Rourke, B., Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (30), 21889-21900.
86. Carr, A.; Frei, B., Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* **1999**, 13 (9), 1007-1024.
87. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* **2006**, 29, 113-123.
88. Naidu, K. A., Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* **2003**, 2 (1), 7.
89. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13 (10), 572-584.
90. Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 96 (2-3), 67-202.
91. Michalak, A., Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, 15 ( 4 ), 523-530.
92. Zhang, H.-Y., Structure-activity relationships and rational design strategies for radical-scavenging antioxidants. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2005**, 1 (3), 257-273.
93. Pietta, P.-G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (7), 1035-1042.
94. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, 82 (4), 513-523.
95. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 20 (7), 933-956.
96. Kaur, I. P.; Geetha, T., Screening methods for antioxidants - A review. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, 6, 305-312.
97. Ndhlala, A.; Moyo, M.; Van Staden, J., Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* **2010**, 15 (10), 6905-6930.
98. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25-30.
99. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, 26 (2), 211-219.

100. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C., Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim. Acta.* **2008**, *613* (1), 1-19.
101. Oliveira, A. C. d.; Valentim, I. B.; Goulart, M. I. O. F.; Silva, C. C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S., Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova.* **2009**, *32*, 689-702.
102. Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H., Analytical chemistry of nitric oxide. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2* (1), 409-433.
103. Lundvig, D. M. S.; Immenschuh, S.; Wagener, F. A. D. T. G., Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly? *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 81.
104. MacKay, D.; Miller, A. L., Nutritional support for wound healing. *Altern. Med. Rev.* **2003**, *8* (4), 359-377.
105. Subhashini, S.; Arunachalam, K. D., Investigations on the phytochemical activities and wound healing properties of *Adhatoda vasica* leave in Swiss albino mice. *Afr. J. Plant Sci.* **2011**, *5* (2), 133-145.
106. Vinholes, J.; Grosso, C.; Andrade, P. B.; Gil-Izquierdo, A.; Valentão, P.; Pinho, P. G. d.; Ferreres, F., *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chem.* **2011**, *129* (2), 454-462.
107. Champagne, A.; Hilbert, G.; Legendre, L.; Lebot, V., Diversity of anthocyanins and other phenolic compounds among tropical root crops from Vanuatu, South Pacific. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24* (3), 315-325.
108. Ferreres, F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A., Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.* **2003**, *14* (6), 352-359.
109. Gil-Izquierdo, A.; Riquelme, M. a. T.; Porras, I.; Ferreres, F., Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *52* (2), 324-331.
110. Sánchez-Rodríguez, E.; Moreno, D. A.; Ferreres, F.; Rubio-Wilhelmi, M. d. M.; Ruiz, J. M., Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry* **2011**, *72* (8), 723-729.

111. Matsuda, H.; Wang, T.; Managi, H.; Yoshikawa, M., Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (24), 5317-5323.
112. Zielińska, D.; Zieliński, H., Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies. *Food Chem.* **2011**, *124* (2), 672-678.
113. Han, R.-M.; Zhang, J.-P.; Skibsted, L. H., Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules* **2012**, *17* (2), 2140-2160.
114. Kang, E. M. S., Dietary flavonoids as protectors from ascorbate-induced oxidative stress *in vivo* [dissertação]. College of Pharmacy and Nutrition University of Saskatchewan Saskatoon, **2007**.